

# **Glykoprotein V-spezifische Thrombozytenantikörper bei Patienten mit Immunthrombozytopenie (ITP)**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Johanna Stoy  
aus Kassel

Gießen 2012

# **Glykoprotein V-spezifische Thrombozytenantikörper bei Patienten mit Immunthrombozytopenie (ITP)**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Johanna Stoy  
aus Kassel

Gießen 2012

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des  
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Direktor: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. Sachs

Gutachter: Prof. Dr. med. Müller-Ladner

Tag der Disputation: 31.01.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Immunthrombozytopenie.....	8
1.1.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie.....	8
1.1.2 Pathophysiologie.....	9
1.1.3 Klinik und Diagnostik.....	11
1.1.4 Therapie und Prognose.....	15
1.2 Thrombozytäre Glykoproteine.....	17
1.2.1 Glykoprotein IIb/IIIa.....	17
1.2.2 Glykoprotein Ib/IX.....	19
1.2.3 Glykoprotein V.....	21
1.3 Zielsetzung der Studie.....	22
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1 Datenanalyse.....	24
2.2 Aufbau des Erfassungsbogens.....	24
2.3 Versendung der Fragebögen.....	25
2.4 Datenauswertung.....	26
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
3.1 Anzahl der ITP-Patienten.....	28
3.2 Allgemeine Daten der Patienten mit (idiopathischer) ITP.....	29
3.2.1 Kollektiv der ITP-Patienten.....	29
3.2.2 Alter und Geschlecht von ITP-Patienten.....	30
3.2.3 Laborchemische Angaben von ITP-Patienten.....	32
3.2.4 Therapieregime bei ITP-Patienten.....	33
3.3 Allgemeine Daten der Patienten mit sekundärer ITP.....	34
3.3.1 Kollektiv der Patienten mit sekundärer ITP.....	34
3.3.2 Alter und Geschlecht der Patienten mit sekundärer ITP.....	34
3.3.3 Grunderkrankungen bei den sekundären ITP-Patienten.....	35
3.4 Direkter Antikörnernachweis der Patienten mit (idiopathischer) ITP.....	36
3.4.1 Antikörnernachweis im direkten MAIPA.....	36
3.4.2 Antikörperverteilung im direkten MAIPA.....	37
3.4.3 Stärke der Antikörperreaktion im direkten MAIPA.....	39
3.5 Direkter Antikörnernachweis bei Patienten mit sekundärer ITP.....	40
3.5.1 Antikörnernachweis im direkten MAIPA.....	40
3.5.2 Antikörperverteilung im direkten MAIPA.....	40
3.5.3 Stärke der Antikörperreaktion im direkten MAIPA.....	41
3.6 Indirekter Antikörnernachweis bei ITP-Patienten (idiopathisch und sekundär).....	42
3.7 Faktoren im Rahmen eines positiven Antikörnernachweises.....	44
3.8 Sensitivität und Spezifität.....	47
3.8.1 Sensitivität und Spezifität ohne Einbeziehung von Antikörpern gegen GP V.....	47
3.8.2 Sensitivität und Spezifität unter Einbeziehung von Antikörpern gegen GP V.....	48

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1	Charakteristika der ITP-Patienten.....	49
4.2	Antikörpernachweis gegen die Glykoproteine IIb/IIIa und Ib/IX.....	50
4.3	Antikörpernachweis gegen Glykoprotein V .....	51
4.4	Einfluss der Glykoprotein-Antikörper auf Thrombozyten und MPV .....	52
4.5	Sekundäre ITP.....	53
4.6	Sensitivität und Spezifität .....	54
4.7	Schlussfolgerung.....	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>58</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>70</b>
	Erfassungsbogen zur ITP .....	70
	Veröffentlichungen .....	71

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen für eine sekundäre ITP (nach Cines et al., 2009, verändert) .....	8
Abbildung 2: Möglicher Diagnosealgorithmus bei ITP (nach Sachs, 2008).....	15
Abbildung 3: Struktur des Glykoproteins IIb/IIIa (nach Kiefel, 2004).....	17
Abbildung 4: Struktur des Glykoprotein Ib/IX/V-Komplexes (nach Kiefel, 2004).....	19
Abbildung 5: Verteilung der Arztpraxen u. Krankenhäuser in Deutschland.....	26
Abbildung 6: Antwortwege der Arztpraxen und Kliniken .....	27
Abbildung 7: Anzahl der ITP-Patienten.....	28
Abbildung 8: Ausschlusskriterien bei ITP-Patienten .....	30
Abbildung 9: Altersverteilung bei Patienten mit ITP .....	31
Abbildung 10: Therapieformen bei Patienten mit ITP .....	33
Abbildung 11: Grunderkrankungen bei Patienten mit Sekundärer ITP .....	36
Abbildung 12: Antikörpernachweis bei Patienten mit ITP .....	37
Abbildung 13: Stärke des Antikörpernachweises im direkten MAIPA .....	39
Abbildung 14: Antikörpernachweis bei Patienten mit sekundärer ITP .....	40
Abbildung 15: Stärke d. Antikörpernachweises im direkten MAIPA bei sekundärer ITP .....	42
Abbildung 16: Indirekter Antikörpernachweis.....	43
Abbildung 17: Antikörperverteilung im indirekten MAIPA.....	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich von Studien bezüglich Sensitivität u. Spezifität im direkten MAIPA .....	14
Tabelle 2: Beteiligung der Arztpraxen und Kliniken an der Studie .....	25
Tabelle 3: Alter der ITP-Patienten .....	31
Tabelle 4: Thrombozyten-, Erythrozyten- und Leukozytenzahlen bei ITP-Patienten.....	32
Tabelle 5: Erhöhtes MPV bei ITP-Patienten und Nicht-ITP-Patienten.....	33
Tabelle 6: Alter der Patienten mit sekundärer ITP .....	35
Tabelle 7: Antikörperverteilung mit durchgeführten AK-Tests gegen alle drei Glykoproteine.	38
Tabelle 8: Antikörperverteilung bei Patienten mit ITP ohne GP V .....	39
Tabelle 9: Antikörperverteilung bei Patienten mit sekundärer ITP.....	41
Tabelle 10: Form der ITP und Antikörpernachweis.....	44
Tabelle 11: Alter und Antikörpernachweis .....	44
Tabelle 12: Geschlecht und Antikörpernachweis.....	45
Tabelle 13: Thrombozytenzahl und Antikörpernachweis .....	45
Tabelle 14: MPV und Antikörpernachweis.....	46
Tabelle 15: AK-Nachweis gegen GP IIb/IIIa.....	47
Tabelle 16: AK-Nachweis gegen GP IIb/IIIa & GP Ib/IX.....	48
Tabelle 17: AK-Nachweis gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX & GP V .....	48
Tabelle 18: Sensitivität, Spezifität und Positiver Prädiktiver Wert.....	48

# 1 Einleitung

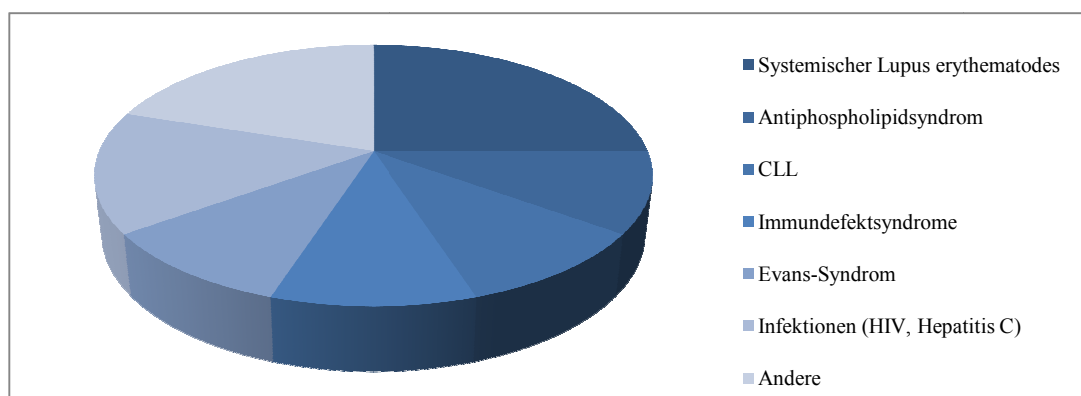
## 1.1 Immunthrombozytopenie

### 1.1.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie

Bei der Immunthrombozytopenie (ITP), auch unter den Namen Morbus Werlhof oder Idiopathische Thrombozytopenische Purpura bekannt, handelt es sich um die Autoimmunerkrankung, die sich gegen Thrombozyten richtet und zu einer isolierten Thrombozytopenie mit erhöhter Blutungsneigung führt.

Die Ursache, warum sich das Immunsystem gegen die Thrombozyten richtet, ist nach wie vor unklar. Bei Kindern tritt eine akute ITP oft vier bis acht Wochen nach einer Virusinfektion auf (Nugent 2002), was den Schluss nahe legt, dass kreuzreaktive Antigene von Viren die Antikörperbildung induzieren (Molekulare Mimikry) (Rand et al. 1998). Bei Erwachsenen werden zwar Zusammenhänge mit Virusinfekten diskutiert, allerdings ist die zeitliche Nähe nicht so ausgeprägt wie bei Kindern.

In den allermeisten Fällen tritt eine ITP ohne erkennbare Ursache, also idiopathisch, auf. Bei bis zu 20% der ITP-Patienten hingegen liegt primär eine andere Erkrankung zugrunde (Cines et al. 2009). Sekundäre Formen der ITP werden beim systemischen Lupus erythematoses, Antiphospholipidsyndrom, Immundefektsyndromen, lymphoproliferativen Erkrankungen sowie bei Infektionen mit HIV oder Hepatitis C beobachtet (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Ursachen für eine sekundäre ITP (nach Cines et al., 2009, verändert)



Die ITP wird in eine akute und eine chronische Verlaufsform unterteilt. Bei der akuten ITP kommt es innerhalb von drei Monaten zu einer Remission, unabhängig davon, ob eine Therapie erfolgt ist. Die akute ITP betrifft vor allem Kinder, die Inzidenz liegt bei 1,1 – 5,3/100.000 pro Jahr (Terrell et al. 2010). Bezüglich des Geschlechts gibt es bei der akuten ITP keine Unterschiede (Cines und Blanchette 2002).

Bei einer Krankheitsdauer von über drei Monaten spricht man von einer chronischen ITP. Die Zahl der Neuerkrankungen beträgt 1,6-3,9/100.000 pro Jahr (Terrell et al. 2010). Frauen sind dabei mit 1,2-1,7:1 etwas häufiger betroffen (Neylon et al. 2003, Frederiksen und Schmidt 1999). Während eine ITP früher vor allem zwischen dem 18. und 40. Lebensjahr beobachtet wurde, liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter heute mit 56 Jahren deutlich höher, die Inzidenz steigt sogar mit zunehmendem Alter (Frederiksen und Schmidt 1999).

### **1.1.2 Pathophysiologie**

Dass es sich bei der ITP um eine Autoimmunerkrankung handelt, konnte in den 50er Jahren bewiesen werden. Damals erzeugte die Übertragung von Plasma von ITP-Patienten bei Gesunden eine über mehrere Tage anhaltende Thrombozytopenie mit klinischen Zeichen einer thrombozytopenischen Purpura (Cines et al. 2002).

Bei der ITP werden Antikörper gegen Glykoproteine der Thrombozyten gebildet. Das erste Antigen, gegen welches Antikörper bei ITP-Patienten nachgewiesen werden konnte, ist Glykoprotein IIb/IIIa (van Leeuwen et al. 1982). Neben Glykoprotein IIb/IIIa wurde später auch Glykoprotein Ib/IX als wichtige Zielstruktur von Antikörpern identifiziert. Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIIa konnten bei 32-39% der ITP-Patienten und Antikörper gegen GP Ib/IX bei 19-22% der ITP-Patienten gefunden werden (Nomura et al. 1991, McMillan 1987). Auch weitere thrombozytäre Antigene, wie Glykoprotein Ia/IIa (Joutsu und Kekomäki, 1997), Glykoprotein VI (Boylan et al. 2004), GMP140 (CD 62) (Bierling et al. 1994) und CD9 (Yanabu et al. 1993) wurden untersucht; eine größere Relevanz in der Pathogenese der ITP konnte aber bei keinem dieser Antigene festgestellt werden.

Häufig ist der Antikörper-Nachweis gleichzeitig gegen mehrere Antigene positiv (He et al. 1994). Bei 40% der ITP-Patienten können hingegen keine Antikörper gefunden werden (Warner et al. 1999), Gründe hierfür werden im Abschnitt der Diagnostik dargestellt.

Bei den thrombozytären Antikörpern handelt es sich überwiegend um Antikörper der Klasse IgG. IgM- und IgA-Antikörper konnten in nur wenigen Fällen nachgewiesen werden, so dass deren Bedeutung in der Pathogenese der ITP als eher gering einzuschätzen ist (Kiefel et al. 1996).

Die Antikörper binden an die Glykoproteine der Thrombozyten. Die opsonierten Thrombozyten werden dann über Fc-Rezeptoren der Makrophagen gebunden und phagozytiert. Hauptort der Antikörpereliminierung ist die Milz (Kuwana et al. 2002), in geringerem Ausmaße findet diese aber auch in Leber und Knochenmark statt. Somit wird die Thrombozyten-Überlebenszeit stark herabgesetzt mit der Folge einer Thrombozytopenie. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung der Thrombozytopenie ist eine verminderte Produktion der Thrombozyten. Zugrunde liegt hier, dass die thrombozytären Antikörper auch in die Reifung der Megakaryozyten zu Thrombozyten eingreifen und diese inhibieren (Chang et al. 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass auch T-Zellen eine nicht unerhebliche Rolle in der Pathogenese der ITP spielen. Durch den direkten Kontakt mit Fragmenten der Glykoproteine, wie GP IIb/IIIa, werden die T-Zellen aktiviert und produzieren daraufhin die Zytokine Interferon- $\gamma$  und Interleukin-2 (Th1-Antwort). Dadurch wird die Antikörpersynthese stimuliert (Kuwana et al. 2001). Autoreaktive T-Zellen werden nicht nur bei ITP-Patienten nachgewiesen, sondern auch im Blut gesunder Patienten. Dort scheinen sie allerdings durch eine sehr niedrige Affinität zu den Glykoproteinen toleriert zu werden (Filion et al. 1996). Bei den ITP-Patienten hingegen sind neben den T-Zellen mit niedriger Affinität auch T-Zellen mit hoher Affinität zu finden. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung der T-Zellen in der Pathophysiologie der ITP liefern Studien, die zeigen, dass ITP-Patienten eine erhöhte Menge an HLA-DR+T-Zellen und an löslichem Interleukin 2 haben (Semple et al. 1996), zudem weisen sie oft einen erhöhten Th1/Th2-Quotienten auf (Stasi et al. 2007).

Von großer Bedeutung in der Pathogenese der ITP ist auch das Oberflächenprotein CD154 (CD40-L), welches unter anderem auf der Oberfläche von Thrombozyten zu finden ist. Dort ist es zuständig für die Interaktion von Thrombozyten und B-Lymphozyten über eine Bindung von CD154 (CD40-L) an CD40 der B-Lymphozyten. Bei ITP-Patienten wurde im Gegensatz zu Gesunden eine erhöhte Menge an CD154 gefunden. Zudem konnte gezeigt werden, dass thrombozytäres CD154 von ITP-Patienten wichtig für die Aktivierung autoreaktiver B-Lymphozyten mit nachfolgender Antikörperproduktion ist (Solanilla et al. 2005).

### **1.1.3 Klinik und Diagnostik**

Das klinische Bild der ITP kann variieren. Viele Patienten sind völlig asymptomatisch, bei anderen Patienten kommt es hingegen zu Blutungszeichen wie Petechien, Purpura, konjunktivalen Einblutungen und Schleimhautblutungen; große Hämatome und Gelenkblutungen sind hingegen eher untypisch für eine ITP. Besonders gefürchtet bei ITP-Patienten sind intrazerebrale Blutungen, die zwar selten auftreten, aber eine hohe Letalität aufweisen (Butros und Bussel 2003).

Das klinische Bild hängt unter anderem vom Krankheitsverlauf ab. Bei einer akuten ITP kommt es einige Wochen nach einem viralen Infekt meist relativ akut zu deutlichen Blutungssymptomen, nicht selten bestehen zu diesem Zeitpunkt noch Lymphknoten-Vergrößerungen und eine leichte Splenomegalie als Zeichen des Infekts. Der Verlauf bei der chronischen ITP ist hingegen eher langsam progredient und oligosymptomatisch, häufig klagen die Patienten über maximal eines der oben genannten Blutungszeichen.

Kinder mit akuter Verlaufsform weisen meist deutlichere klinische Blutungszeichen auf als Erwachsene mit chronischer Verlaufsform, lebensgefährliche Blutungskomplikationen treten aber vor allem bei Patienten über 60 Jahren auf (Cortelazzo et al. 1991). Ein erhöhtes Risiko von Blutungskomplikationen besteht ebenfalls bei Patienten mit hoher Multimorbidität.

Bei der Diagnostik einer ITP wird unterschieden zwischen einer sogenannten Basisdiagnostik, die bei Patienten durchgeführt wird, bei denen eine ITP vermutet, aber noch nicht gesichert ist, und einer erweiterten Diagnostik, die bei jenen Patienten durchgeführt wird, wo eine ITP bereits diagnostiziert wurde und der Verlauf bereits in eine chronische Verlaufsform übergegangen ist (Matzdorff et al. 2010).

Bei Verdacht auf eine ITP sollten zunächst Anamnese, körperliche Untersuchung und die Anfertigung eines Blutbildes erfolgen. Während Anamnese und körperliche Untersuchung bis auf eine oft erhöhte Blutungsneigung in der Regel unauffällig sind, fällt im Blutbild meist eine isolierte Thrombozytopenie auf. Es kann allerdings zu sekundär bedingten Veränderungen kommen, wie beispielsweise einer Anämie durch Blutungen. Im Blutaussstrich sind nicht selten große Plättchen bei ITP-Patienten zu finden. Diese sind aber, ebenso wie die Thrombozytopenie, nicht spezifisch für eine ITP. Die Basisdiagnostik von Patienten mit Verdacht auf ITP zielt nicht nur darauf ab, die Diagnose einer ITP zu bestätigen, sondern vielmehr auch Differenzialdiagnosen, die ebenfalls mit einer Thrombozytopenie einhergehen, auszuschließen. Die häufigste

Differenzialdiagnose der ITP, obgleich ohne Krankheitswert, ist die Pseudothrombozytopenie, die durch eine Thrombozytenagglutination im EDTA-Blut bedingt ist und daher fälschlicherweise zu niedrige Thrombozytenzahlen aufweist. Zusätzlich sollte eine Thrombozytenzählung im Citrat-Blut durchgeführt werden, bei der die Thrombozyten im Falle einer Pseudothrombozytopenie im Normbereich liegen. Weitere Differenzialdiagnosen der ITP sind eine medikamenteninduzierte Thrombozytopenie, die durch eine ausführliche Medikamentenanamnese ausgeschlossen werden kann, hämatologische Erkrankungen, die sich durch eine Knochenmarkpunktion von einer ITP differenzieren lassen, sowie die nicht selten mit verminderten Thrombozytenzahlen einhergehenden Schilddrüsenerkrankungen, wie beispielsweise die Hashimoto-Thyreoiditis, die allerdings durch eine Bestimmung der Schilddrüsenparameter ausgeschlossen werden können. Bei Kindern sollte man zudem an seltene hereditäre Thrombozytopenien, wie beispielsweise das Bernard-Soulier-Syndrom, sowie an eine Neonatale Alloimmunthrombozytopenie denken; bei Schwangeren sollte eine Schwangerschafts-assoziierte Thrombozytopenie in Erwägung gezogen werden.

Im Falle einer persistierenden ITP ist eine Ausweitung der Diagnostik empfehlenswert. Dieses gilt insbesondere für Patienten, bei denen eine Steroidtherapie nicht oder nur kurzfristig zu einem Anstieg der Thrombozytenzahlen geführt hat (Matzdorff et al. 2010). Hier werden Antikörper-Tests gegen Thrombozyten eingesetzt, die im Falle eines positiven Antikörper-Nachweises eine immunologische Genese beweisen. Bei den Antikörper-Tests wird zwischen unspezifischen und Glykoprotein-spezifischen Tests unterschieden.

Unspezifische Antikörper-Tests weisen die Gesamtmenge an Immunglobulinen auf Thrombozyten nach (platelet associated IgG, PAIgG). Hierbei werden aber nicht nur Autoantikörper erfasst, sondern auch in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichertes IgG, unspezifisch an die Thrombozyten angelagertes IgG und an thrombozytäre Fc-Rezeptoren gebundenes IgG. Dadurch ergibt sich eine geringe Spezifität, der Test kann nicht sicher zwischen einer Thrombozytopenie immunologischer und anderer Genese unterscheiden. Beispiele für unspezifische Antikörper-Tests sind Immunfluoreszenztests wie der PSIFT (Plättchen-Suspensions-Immunfluoreszenztest) und der PIFT (Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest), welche Antikörper durch Verwendung von fluoreszierenden Anti-Human-Antikörpern nachweisen (von dem Borne et al. 1978, Schneider und Schnaidt, 1981), sowie die Durchflusszytometrie (Tazzari et al. 1995).

Glykoprotein-spezifische Tests können thrombozytäre Antikörper Antigen-spezifisch nachweisen. Dazu gehörten zunächst die Radioimmunpräzipitation (Mulder et al. 1984) und der Western Blot (van der Schoot et al. 1986), die Antikörper durch eine Messung des Molekulargewichts in der SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) detektieren. Beide Tests waren aber in der Durchführung sehr zeitaufwendig. Für die Routinediagnostik besser geeignet sind der Immunobead Assay (McMillan et al. 1987) und der MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens) (Kiefel et al. 1987). Hierbei werden die Antikörper gegen thrombozytäre Glykoproteine durch einen monoklonalen Mausantikörper gebunden und schließlich über einen enzymmarkierten Ziege-anti-Human-Antikörper nachweisbar gemacht. Ein neueres Verfahren ist der SASPA (Simultaneous Analysis of Specific Platelet Antibodies), ein Antigen-spezifischer Test zum Nachweis von thrombozytären Antikörpern in der Durchflusszytometrie. Er erzielt in Studien gleich gute Ergebnisse wie der MAIPA, ist aber bisher nicht allgemein anerkannt (Nguyen et al. 2004, Nguyen et al. 2010).

Bei den Glykoprotein-spezifischen Tests ist sowohl ein Nachweis von Plättchen-gebundenen Antikörpern (direkter Test) als auch ein Nachweis von freien Antikörpern (indirekter Test) möglich; freie Antikörper können im Gegensatz zu Plättchen-gebundenen allerdings sehr viel seltener nachgewiesen werden, so dass der indirekte Nachweis weniger sinnvoll erscheint (Berchtold et al. 1997).

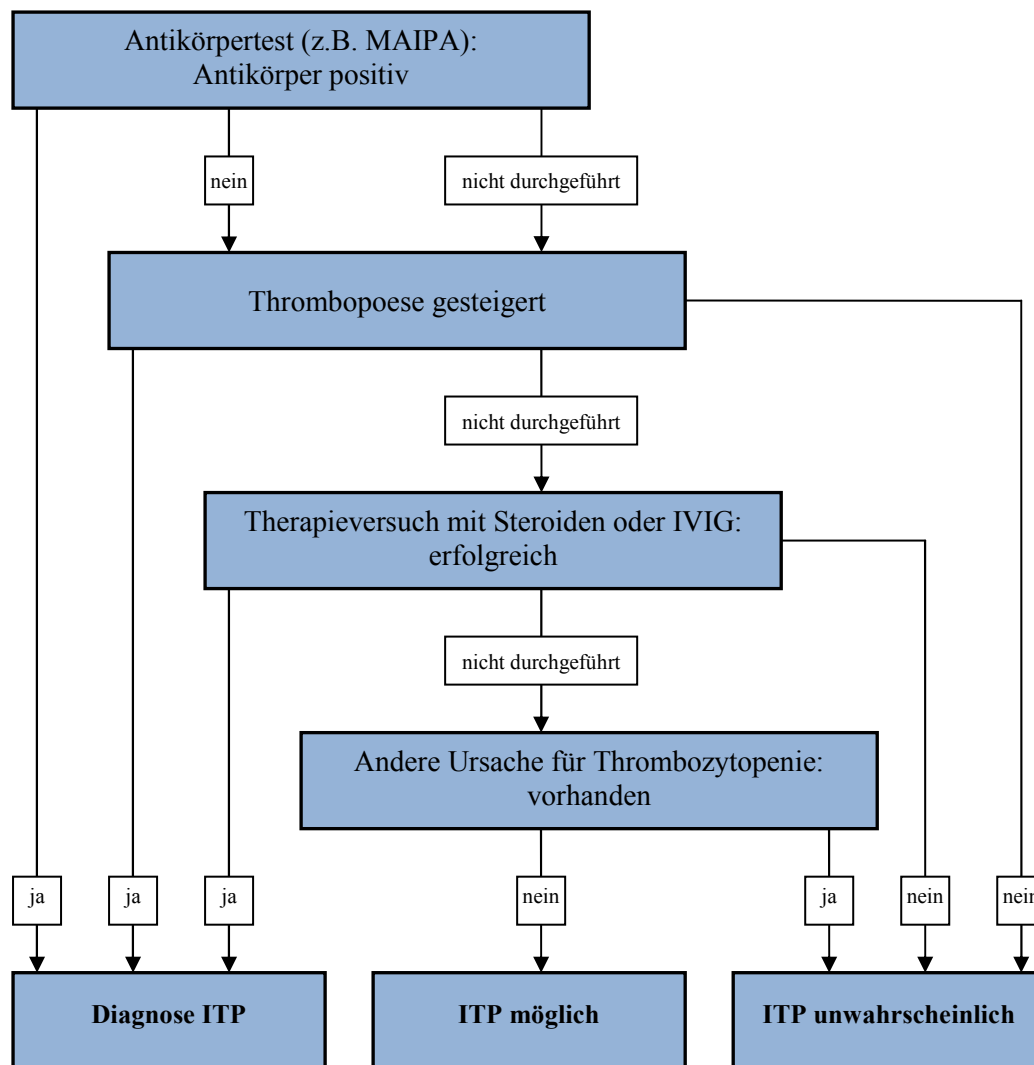
Die Spezifität des direkten MAIPA liegt in Studien bei 78-100%, folglich hat ein positiver Antikörpernachweis eine hohe Beweiskraft. Die Sensitivität hingegen liegt bei nur 39%-49% (Tabelle 1). So bleibt bislang festzuhalten, dass durch Glykoprotein-spezifische Antikörpertests im Falle eines positiven Antikörpernachweises die Diagnose einer ITP bestätigt, im Falle eines negativen Antikörpernachweises eine ITP aber nicht ausgeschlossen werden kann.

**Tabelle 1:** Vergleich von Studien bezüglich Sensitivität u. Spezifität im direkten MAIPA

Sensitivität	Spezifität	Referenz
46%	100%	Kiefel et al. 1996
49%	78%	Brighton et al. 1996
39%	92%	Warner et al. 1999
39%	97%	Hagenström et al. 2000

Eine weitere diagnostische Möglichkeit ist die Durchführung einer Knochenmarkpunktion. Bei ITP-Patienten findet man häufig eine leicht erhöhte Anzahl an Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten. Eine erhöhte Megakaryopoese ist allerdings auch bei anderen Erkrankungen zu finden, zudem kann der Knochenmarkbefund bei ITP-Patienten völlig unauffällig sein. Eine Lymphom- oder Tumordinfiltration kann aber als Differenzialdiagnose ausgeschlossen werden. Somit sollte eine Knochenmarkpunktion vor allem dann durchgeführt werden, wenn Patienten eine atypische Klinik (z.B. eine Splenomegalie) oder atypische Blutergebnisse (z.B. eine Leukozytopenie) aufweisen. Auch Patienten, die über 60 Jahre alt sind oder vor einer geplanten Splenektomie stehen, sollten sich einer Knochenmarkpunktion unterziehen (George et al. 1996).

Es gibt verschiedene Empfehlungen, in welcher Reihenfolge diagnostische Untersuchungen bei Patienten mit Verdacht auf ITP vorgenommen werden sollten, ein einheitliches Diagnostikschema besteht aber nicht. Abbildung 2 zeigt ein mögliches Vorgehen in der ITP-Diagnostik.



**Abbildung 2:** Möglicher Diagnosealgorithmus bei ITP (nach Sachs, 2008)

#### 1.1.4 Therapie und Prognose

Ziel der Therapie bei ITP-Patienten ist es, schwere Blutungen zu vermeiden. Bei der Fragestellung, wann eine Therapie begonnen werden sollte, orientierten sich bisherige Leitlinien meist an der Thrombozytenzahl. So empfiehlt die Amerikanische Gesellschaft für Hämatologie eine Therapieeinleitung bei ITP-Patienten mit einer Thrombozytenzahl unter 50.000/ $\mu$ l und deutlicher Blutungsneigung, sowie bei Patienten mit einer Thrombozytenzahl unter 20.000/ $\mu$ l auch ohne Blutungszeichen; dieses gilt sowohl für akute als auch für chronische Verläufe (George et al. 1996). Neuere Leitlinien machen eine Therapieindikation nicht alleine an der Thrombozytenzahl fest. Matzdorff et al. (2010) empfehlen vielmehr, sich an der Blutungsneigung gemäß dem Blutungsscore der WHO zu orientieren. Provan et al. (2011) beziehen neben der Thrombozytenzahl und der klinischen Blutungsneigung noch weitere Faktoren wie

Komorbiditäten, Nebenwirkungsspektrum der Medikamente, Erwartung und Meinung der Patienten mit in die Entscheidung ein, wann eine Therapie eingeleitet werden sollte. Bei den meisten ITP-Patienten ist keine medikamentöse Therapie erforderlich, sondern eine engmaschige Überwachung ausreichend. Lediglich vor geplanten Operationen sollte die Thrombozytenzahl abhängig von der Art der geplanten OP stärker angehoben werden.

Ist die Indikation zur medikamentösen Therapie gegeben, sind Steroide Mittel der Wahl. Sie führen zu einer Anhebung der Thrombozytenzahl, indem sie die Phagozytose der Thrombozyten durch Makrophagen hemmen (Handin und Stossel 1978), die Antikörper-Produktion supprimieren (Fujisawa et al. 1993) und zudem einen gefäßabdichtenden Effekt haben (Kitchens und Pendergast 1986) und somit auch bei akuten Blutungen wirksam sind. Auf Steroide sprechen zwei Drittel der ITP-Patienten initial an (George et al. 1996), eine dauerhafte Remission wird allerdings bei nur einem Viertel der Patienten mit chronischem Verlauf erreicht (Portielje et al. 2001). Eine wichtige Rolle in der Therapie der ITP spielen auch intravenöse Immunglobuline (IVIG), die ebenfalls eine hemmende Funktion auf die Phagozytose der Thrombozyten haben (Burdach et al. 1986). Die IVIG werden vor allem bei akuten Blutungsepisoden eingesetzt (ggf. in Kombination mit Steroiden und Thrombozytenkonzentraten), da sie bei über 80% der Patienten einen raschen Anstieg der Thrombozytenzahl bewirken; eine dauerhafte Remission ist bei chronischen ITP-Patienten allerdings selten (Bussel und Pham 1987). Führt die Therapie mit Steroiden oder IVIG nicht zu einer ausreichenden Anhebung der Thrombozytenzahl, kann eine Splenektomie in Erwägung gezogen werden; hierbei wird das Hauptorgan der Antikörpereliminierung entfernt. Der Erfolg einer Splenektomie kann allerdings nicht vorausgesagt werden, zudem besteht die Gefahr von lebensgefährlichen postoperativen Infektionen; die Mortalität beträgt ca. 1% (Schilling 1995).

Während Steroide, IVIG und eine Splenektomie zu den gängigen Optionen in der Behandlung der ITP zählen, gibt es weitere Medikamente, die für die Behandlung der ITP zugelassen sind, bisher aber nur selten eingesetzt werden, da sie bezüglich der Wirksamkeit nicht ausreichend getestet sind. Dazu gehören der monoklonale Antikörper Anti-CD20, auch unter dem Namen Rituximab bekannt, das Androgen Danazol, das Sulfon Dapson, Vinkaalkaloide, sowie die Immunsuppressiva Azathioprin, Cyclophosphamid, Cyclosporin A und Mycophenolat mofetil, diese Medikamente sind jedoch alle nicht zugelassen. Neuere Medikamente sind Thrombopoetin-Agonisten. Der



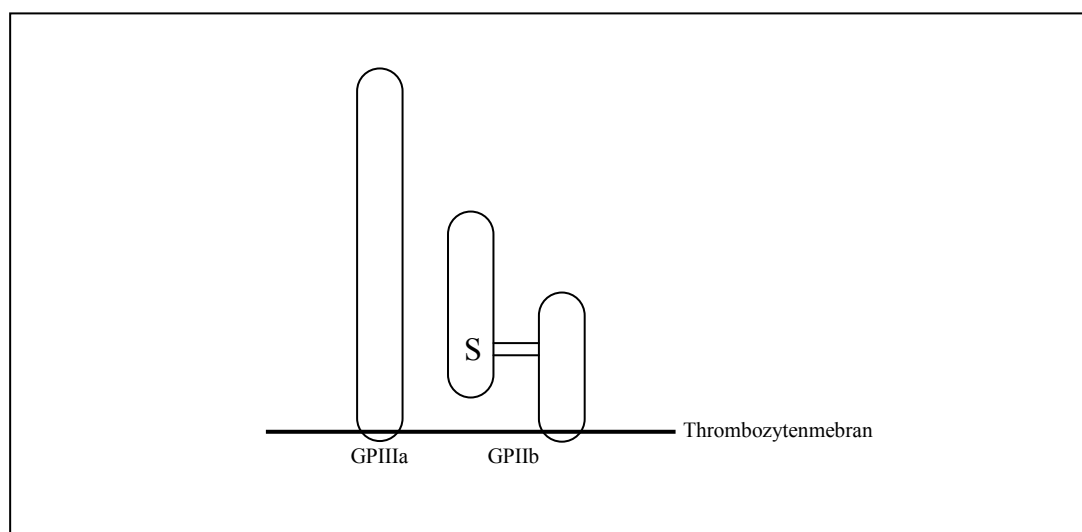
erste in Europa zugelassene thrombopoetische Wirkstoff ist Romiplostin (Nplate®), der durch eine Stimulation der Thrombozytenproduktion zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl bei ITP-Patienten führt (Kuter et al. 2008).

Die Prognose bei akuten Verläufen der ITP ist ausgesprochen gut. Bei den meisten Patienten remittiert eine ITP auch ohne Therapie innerhalb weniger Wochen. Bei den chronischen Verläufen ist eine spontane Remission ohne Therapie hingegen selten. Und auch gegen eine medikamentöse Therapie inklusive Splenektomie erweist sich ein Drittel der Patienten als refraktär (Stasi 2001 zit. in Stasi et al. 2008).

## 1.2 Thrombozytäre Glykoproteine

### 1.2.1 Glykoprotein IIb/IIIa

Glykoprotein IIb/IIIa gehört zur Gruppe der Integrine, einer Gruppe von Rezeptorproteinen, die für die Interaktion der Zellen untereinander und mit der Extrazellulärmatrix zuständig sind. GP IIb/IIIa ist ein Heterodimer mit zwei Untereinheiten, GP IIb und GP IIIa, die durch eine nicht-kovalente, Calcium-abhängige Verbindung miteinander assoziiert sind (Jennings und Phillips 1982) (Abbildung 3). Ein Thrombozyt enthält ca. 80.000 GP IIb/IIIa-Rezeptoren (Wagner et al. 1996). 65% dieser Komplexe befinden sich auf der Thrombozytenoberfläche (Isenberg et al. 1987), der Rest wird intrazellulär im offenen kanalikulären System und in  $\alpha$ -Granula gespeichert und erst nach Thrombozytenaktivierung an die Oberfläche der Thrombozyten abgegeben (Woods et al. 1986, Wencel-Drake et al. 1986).



**Abbildung 3:** Struktur des Glykoproteins IIb/IIIa (nach Kiefel, 2004)

Glykoprotein IIb ( $\alpha$ IIb) weist ein Molekulargewicht von 142 kD (Phillips und Agin, 1977) auf und besteht aus zwei Untereinheiten, die 116 kD bzw. 23 kD schwer sind, und durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Carrell et al. 1985). GP IIb durchdringt die Zellmembran der Thrombozyten und besteht somit aus einem intrazellulären Teil, einer transmembranären Domäne und einem extrazellulären Teil (Hynes 1992). Letzter enthält eine Bindungsstelle für Fibrinogen, welche über die Aminosäuresignalsequenz KQAGDV (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) am C-terminalen Ende der  $\gamma$ -Kette des Fibrinogens erkannt wird (Kloczewiak et al. 1984).

Glykoprotein IIIa ( $\beta$ 3) besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und weist ein Molekulargewicht von 108 kD auf (Carrell et al. 1985). Wie auch GP IIb besteht GP IIIa aus einem extrazellulären Teil, einer transmembranären Domäne und einem intrazellulärem Teil. Typisches Merkmal aller Integrine ist, dass sie mit ihrer extrazellulären Domäne RGD-Sequenzen (Arg-Gly-Asp) binden können, die unter anderem im Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Vitronectin enthalten sind. Diese Bindungsstelle für RGD-Sequenzen liegt in der GPIIIa-Untereinheit (Pytela et al. 1986, D'Souza et al. 1988). Somit enthalten beide GP IIb/IIIa-Untereinheiten Bindungsstellen für Fibrinogen. Des Weiteren weist GP IIIa in seiner intrazytoplasmatischen Domäne ein GFFKR-Motiv auf, das dafür verantwortlich ist, dass GP IIb/IIIa solange in seiner inaktiven Form verweilt, bis es zu Veränderungen in der GFFKR-Region und damit zu einer Konformationsänderung des GP IIb/IIIa-Rezeptors kommt (O'Toole et al. 1994).

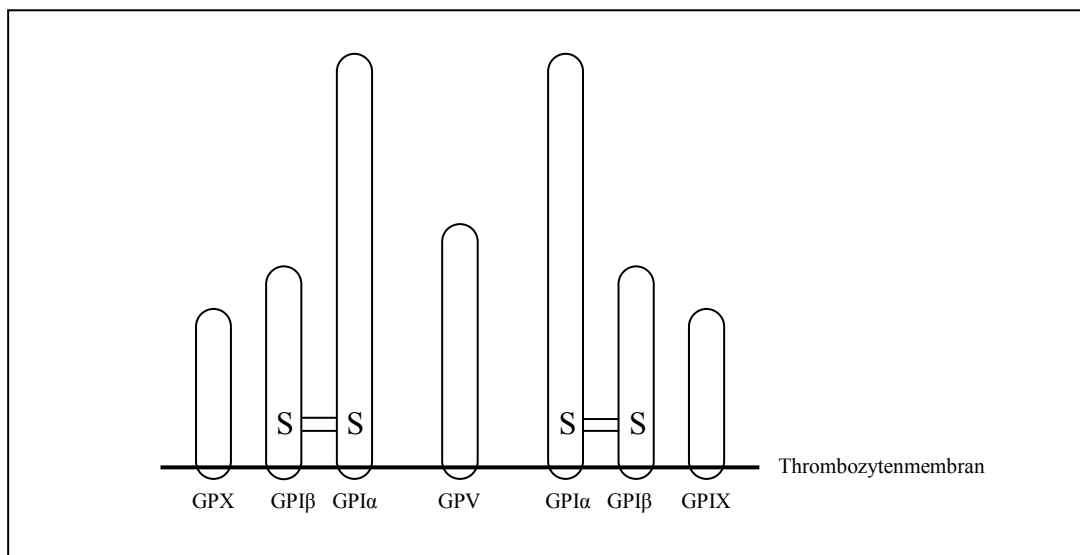
Die Gene für GP IIb und IIIa befinden sich auf dem Chromosom 17 (Bray et al. 1987). Das Gen von GP IIb weist 30 Exons auf, deren Länge zwischen 45 und 249 Basenpaaren liegt (Heidenreich et al. 1990), das Gen von GP IIIa enthält 14 Exons mit einer Länge zwischen 9 und 3618 Basenpaaren (Zimrin et al. 1990).

Der GP IIb/IIIa-Komplex wird auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert, befindet sich dabei aber in einem nicht-aktiven Funktionszustand. Bindet Glykoprotein Ib an den vWF (siehe 1.2.2), kommt es zu einer Aktivierung intrazellulärer Kaskaden, wodurch GP IIb/IIIa in eine aktive Form überführt wird (Inside-Out-Signaling) (Savage et al. 1992); eine zusätzliche Stimulation erfolgt durch Agonisten wie Thrombin, ADP und Thromboxan A<sub>2</sub>. So kann GP IIb/IIIa über die beiden oben beschriebenen Bindungsstellen Fibrinogen binden und die Thrombozyten durch das Fibrinogen miteinander vernetzen, es kommt zur Plättchenaggregation. Die Bindung zwischen GP IIb/IIIa und Ligand bewirkt eine Signalübertragung ins Zellinnere der Thrombozyten,

woraufhin verschiedene intrazelluläre Prozesse ablaufen, die zu einer weiteren Aktivierungsverstärkung der Thrombozyten führen (Outside-In-Signaling).

### 1.2.2 Glykoprotein Ib/IX

GP Ib/IX setzt sich zusammen aus den Glykoproteinen Ib und IX. Glykoprotein Ib ist ein Heterodimer, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Phillips und Agin 1977). GP Ib ist mit einem weiteren Glykoprotein, dem GP IX, vollständig in der Thrombozytenmembran verzweigt (Du et al., 1987). Zusammen mit dem Glykoprotein V bildet GP Ib/IX den von Willebrand-Faktor-Rezeptor (GP Ib/IX/V) (Abbildung 4), der in ca. 25.000 Kopien auf einem Thrombozyten zu finden ist (Andrew et al. 1999).



**Abbildung 4:** Struktur des Glykoprotein Ib/IX/V-Komplexes (nach Kiefel, 2004)

Die Untereinheit GP Ib $\alpha$  weist ein Molekulargewicht von 143 kD auf (Phillips und Agin 1977). Insgesamt enthält GP Ib $\alpha$  vier Domänen: ein zytoplasmatisches Segment, eine transmembranäre Domäne, ein Muzin-ähnliches Segment (Makroglykopeptid) und am N-terminalen Ende sieben Leucin-reiche Tandem-Repeats (Andrews et al. 1999). Durch dieses Merkmal der Leucin-reichen Abschnitte gehört GP Ib $\alpha$  wie auch die anderen drei Untereinheiten des von Willebrand-Faktor-Rezeptors zur Gruppe der Leucin-reichen Glykoproteine (LRG). Die LRG spielen eine wichtige Rolle bei den Interaktionen zwischen Proteinen (Kobe et Kajava 2001), die genaue Funktion ist aber unklar. Durch eine endogene Calcium-abhängige Protease kann GP Ib $\alpha$  gespalten werden (Clemetson et al. 1981). Dabei entstehen ein 20 kD schwerer, weiterhin in der

Membran verankerter C-terminaler Teil (Wicki und Clemetson 1987) und ein 118 kD schwerer, wasserlöslicher N-terminaler Teil, der aufgrund seines hohen Kohlenhydratgehalts als Glykocalicin bezeichnet wird (Carnahan und Cunningham, 1983). Trypsin wiederum kann Glykocalicin spalten in zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 45 kD bzw. 35 kD (Wicki und Clemetson 1985, Handa et al. 1986). Das 45 kD schwere Spaltprodukt, welches sich am N-terminalen Teil befindet, besitzt Bindungsstellen für den von Willebrand-Faktor (AS 251-279) (Handa et al. 1986, Vincente et al. 1990) und für Thrombin (AS 271-284) (De Marco et al. 1994). Die  $\beta$ -Kette des GP Ib ist deutlich kleiner als die  $\alpha$ -Kette, ihr Molekulargewicht beträgt 22 kD (Phillips et al. 1977). Aufgebaut ist GP Ib aus einem zytoplasmatischen Teil, einer transmembranären Domäne und einem extrazellulären Teil, der eine Leucin-reiche Domäne enthält. Damit gehört auch GP Ib zur Gruppe der LRG (Andrews et al. 1999). Dass es aber nur eine einzige Leucin-reiche Domäne enthält, ist für ein Mitglied der LRG eher ungewöhnlich.

Das Glykoprotein IX hat ein Molekulargewicht von 22 kD und ähnelt strukturell dem GP Ib (Wicki und Clemetson 1987). So besitzt auch GP IX nur eine einzige Leucin-reiche Domäne trotz Zugehörigkeit zur Gruppe der LRG (Andrews et al. 1999).

Das Gen für GP Ib $\alpha$  befindet sich auf dem Chromosom 17 (Genlokus 17p-12-ter) (Wenger et al. 1989). Wie auch die Gene der anderen Untereinheiten des Glykoprotein Ib/IX-Komplexes ist das Gen von GP Ib $\alpha$  klein und einfach strukturiert. Es besitzt nur ein einziges Intron, der offene Leserahmen befindet sich ausschließlich im zweiten Exon (Wenger et al. 1988). Das Gen für GP Ib $\beta$  ist auf dem Chromosom 22q11.2 lokalisiert (Kelly et al. 1994). Es umfasst wie das Gen von Ib $\alpha$  zwei Exons und ein Intron. Anders als beim Gen Ib $\alpha$  wird der offene Leserahmen hier durch das Intron unterbrochen (Yagi et al. 1994). Das Gen für GP IX befindet sich auf dem Chromosom 3q21 (Hickey et al. 1990). Das Gen enthält drei Exons und zwei Introns, wobei sich der komplette offene Leserahmen im dritten Exon befindet (Hickey und Roth 1993).

Alle drei Untereinheiten, GP Ib $\alpha$ , GP Ib $\beta$  und GP IX, werden für eine stabile Expression des Glykoprotein Ib/IX auf der Thrombozytenoberfläche benötigt. Wie oben beschrieben bildet das Glykoprotein Ib/IX zusammen mit dem Glykoprotein V den von Willebrand-Faktor-Rezeptor (GP Ib/IX/V-Komplex), der in der primären Hämostase eine wichtige Rolle spielt. Kommt es zu einer Verletzung eines Blutgefäßes, bindet der von Willebrand-Faktor (vWF), ein von Endothelzellen produziertes Protein, an das Kollagen der Extrazellulärmatrix. Nun kann der GP Ib/IX/V-Komplex über seine vWF-

Bindungsstelle des GP Ib $\alpha$  eine Verknüpfung zum vWF herstellen und somit eine Adhäsion der Thrombozyten an das Gefäßsubendothel erwirken. Löslichen vWF im Plasma bindet der GP Ib/IX/V-Komplex hingegen nicht. Ursächlich hierfür scheint eine Konformationsänderung des GP Ib/IX/V-Komplexes oder des vWF zu sein, die erst nach Kontakt des vWF mit dem Kollagen erfolgt.

Der GP Ib/IX/V-Komplex enthält zudem in der GPIb $\alpha$ -Untereinheit eine Bindungsstelle für das Enzym Thrombin, welches die Plättchen aktivieren kann. Auf den Thrombozyten befinden sich noch weitere Bindungsstellen für Thrombin, als wichtigste wäre PAR-1 zu nennen. Diaz-Ricart et al. (2005) haben gezeigt, dass für eine vollständige Thrombin-induzierte Plättchenaktivierung die Intaktheit beider Rezeptoren, GP Ib/IX/V und PAR-1, erforderlich ist. Der GP Ib/IX/V-Komplex ist dabei der hochaffine Rezeptor für Thrombin.

### **1.2.3 Glykoprotein V**

Das Glykoprotein V weist ein Molekulargewicht von 82 kD auf (Hickey und Roth, 1993) und ist aufgebaut aus einem kurzen, zytoplasmatischen Teil, einer transmembranären Domäne und einem extrazellulären Teil, der 15 Leucin-reiche Repeats enthält (Andrews et al. 1999). Somit gehört auch GP V zur Gruppe der LRG (Leucin-reiche Glykoproteine). Durch Thrombin kann ein 69 kD-schweres Fragment abgespalten werden, was als GP Vfl bezeichnet wird (Roth et al. 1990).

Das Gen für GP V befindet sich wie das Gen für GP IX auf dem langen Arm des Chromosoms 3, das Gen für GP V ist innerhalb des Bandes 29 lokalisiert (Yagi et al. 1995). Es enthält zwei Exons und ein Intron, wobei die kodierende Sequenz komplett innerhalb eines Exons liegt (Lanza et al. 1993).

Wie bereits oben beschrieben, bildet GP V zusammen mit GP Ib/IX einen Komplex, den von Willebrand-Faktor-Rezeptor. Die Verbindung zum GP Ib/IX besteht über die Untereinheit Ib $\alpha$  (Li et al. 1995) und ist nicht-kovalent (Modderman et al. 1992). Für GP V ist diese Assoziation erforderlich, um effizient auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert zu werden (Meyer und Fox 1995). Das Verhältnis von GP Ib/IX zu GP V beträgt 2:1, das heißt der GP Ib/IX/V-Komplex besteht aus zwei Molekülen GP Ib/IX und einem Molekül GP V.

Der GP Ib/IX/V-Komplex bindet vWF und Thrombin. Es stellt sich die Frage, welche Rolle GP V dabei übernimmt. Für die Expression von GP Ib/IX ist GP V nicht

notwendig, es verstärkt diese aber und erhöht somit die Bindungskapazität der Thrombozyten für den von Willebrand-Faktor (Meyer und Fox 1995).

Thrombin spaltet GP V, diese Proteolyse ist allerdings kein Trigger für die Thrombozytenaktivierung und –aggregation (Bienz et al. 1986, Jandrot-Perrus et al. 1987). Ramakrishnan et al. (1999) zeigten vielmehr, dass GP V eher ein negativer Modulator für die Plättchenaktivierung ist, da die Thrombozyten in Abwesenheit von GP V stärker auf Thrombin ansprachen. Die genaue Funktion des Glykoprotein V ist aber nach wie vor unklar.

### **1.3 Zielsetzung der Studie**

Wie bereits beschrieben weisen Glykoprotein-spezifische Tests bislang nur eine Sensitivität von 39-49% auf, d.h. es können bei vielen ITP-Patienten keine Antikörper gefunden werden. Mögliche Ursache hierfür ist die Tatsache, dass es aufgrund der verminderten Thrombozytenzahl nicht immer möglich ist, alle Glykoproteine auf eine Beladung mit Autoantikörpern zu untersuchen. Zudem benötigt der MAIPA mehrere Waschschritte, in dessen Verlauf es zur Dissoziation des Antikörpers und damit zu einer Beeinträchtigung der Sensitivität kommen kann (Bakchoul et al. 2007). Ein weiterer Grund für den oft negativen Antikörper-Nachweis könnte sein, dass bislang in der Regel nur Antikörper gegen die Glykoproteine Ib/IIIa und Ib/IX getestet wird; eine Ausweitung der Tests gegen zusätzliche Zielantigene könnte zu einer Verbesserung der Sensitivität führen. Die bisher untersuchten thrombozytären Antigene GPIa/IIa, GP VI, GMP140 und CD9 (Abschnitt Pathophysiologie) zeigten allerdings keine ausreichende Relevanz.

Ein weiteres wichtiges Glykoprotein, das sich auf der Oberfläche der Thrombozyten befindet, ist das Glykoprotein V, das Teil des von Willebrand-Faktor-Rezeptors ist. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Glykoprotein V ein wichtiges Zielantigen sowohl bei Kindern mit Varizellen-assoziiierter Thrombozytopenie (Mayer und Beardsley 1996) als auch bei Patienten mit medikamenteninduzierter Thrombozytopenie durch das Antiarrhythmikum Chinidin (Stricker und Shuman, 1986) und durch die bei rheumatoider Arthritis eingesetzten Gold-Verbindungen ist (Garner et al. 2002). Es stellt sich die Frage, ob Glykoprotein V auch eine wichtige Rolle als Antigen bei Patienten mit einer ITP spielt. Joutsu et al. (1997, 2001) führten bereits Antikörpertests gegen GP V durch und konnten positive Resultate in 10-22%

verzeichnen, allerdings handelte es sich bei dem Patientenkollektiv nicht um klinisch definierte ITP-Patienten, sondern um thrombozytopenie Patienten mit positivem PIFT.

In dieser Studie sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist Glykoprotein V ein relevantes Zielantigen im Rahmen der Antikörperproduktion bei ITP-Patienten?
2. Verbessert die Hinzunahme des Antikörperrnachweises gegen Glykoprotein V die Sensitivität der Glykoprotein-spezifischen Antikörpertests?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Datenanalyse**

Das Protokoll dieser Studie wurde der Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgelegt, woraufhin ein zustimmendes Votum erteilt wurde.

Es erfolgte eine Datenauswertung von Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer ITP, deren Blutproben auf den Nachweis von antithrombozytären Antikörpern im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Gießen untersucht wurden. Die Blutproben stammten aus verschiedenen Arztpraxen und Kliniken in Deutschland. Die Datenerfassung wurde für den Zeitraum 2007 bis 2008 vorgenommen; von Blutproben aus dem Uniklinikum Gießen wurden zusätzlich noch die Daten des Jahres 2009 hinzugezogen. Insgesamt wurden 1511 Patientendaten ausgewertet.

Anhand den der Blutproben beigefügten Einsendungsbögen wurden Alter und Geschlecht der Patienten erfasst sowie, sofern angegeben, die in den Praxen oder Kliniken erhobenen Befunde der klinischen Untersuchung und des Blutbildes.

Im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Gießen wurden folgende Daten erhoben und erfasst:

Blutbild (Thrombozyten, Erythrozyten, Leukozyten)

MPV (durchschnittliches Thrombozytenvolumen)

Direkter MAIPA gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V

Indirekter MAIPA gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V

Die Erfassung der Daten erfolgte mit dem PC-Programm Excel 2007 (Microsoft).

### **2.2 Aufbau des Erfassungsbogens**

Anhand eines Fragebogens sollten zusätzliche Daten der Patienten erhoben werden, um die Diagnose einer ITP nach aktuellen Empfehlungen zu sichern oder auszuschließen. Der Erfassungsbogen gliederte sich in drei Teile. Im ersten Teil wurde nach der ärztlichen Verdachtsdiagnose, nach der Dauer der Erkrankung und möglichen Begleiterkrankungen gefragt. Im zweiten Teil sollten die klinischen Befunde erläutert werden, insbesondere ob Milz, Leber oder Lymphknoten vergrößert sind und wie der Knochenmarkbefund im Falle einer durchgeführten Knochenmarkpunktion aussieht. Der dritte Teil beinhaltete Eintragsfelder für die in den entsprechenden Kliniken oder



Arztpraxen erhobenen Laborbefunde, wie Blutbild (Thrombozyten, Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Retikulozyten) und klinisch-chemische Befunde (LDH, Haptoglobin, Quick, PTT). Der Erfassungsbogen ist im Anhang abgebildet.

## 2.3 Versendung der Fragebögen

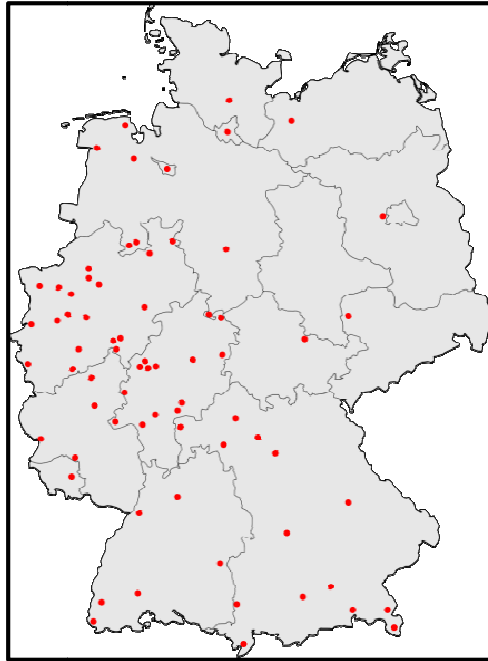
Die Fragebögen wurden an die jeweiligen Kliniken und Arztpraxen versandt mit der Bitte, diesen auszufüllen und ggf. die Arztbriefe dieser Patienten mitzuschicken.

Für die ausgewerteten Daten des Jahres 2007 wurden 188 Kliniken und Arztpraxen angeschrieben. Die Praxen/Kliniken wiesen dabei zwischen einem und 72 Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer ITP auf. 75 Kliniken und Arztpraxen beteiligten sich an der Studie (39,9%). Das Vorgehen wurde für die Daten des Jahres 2008 wiederholt. Dabei wurden 165 Kliniken und Arztpraxen angeschrieben, die Praxen/Kliniken wiesen dabei zwischen einem und 53 Patienten auf. Es beteiligten sich 56 Kliniken und Arztpraxen (33,9%) (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Beteiligung der Arztpraxen und Kliniken an der Studie

	2007	2008
Anzahl Kliniken / Arztpraxen angeschrieben	188	165
Anzahl Kliniken / Arztpraxen geantwortet	75	56
Anteil Kliniken / Arztpraxen geantwortet	39,9%	33,9%
Minimum Patienten pro Klinik / Praxis	1	1
Maximum Patienten pro Klinik / Praxis	72	53

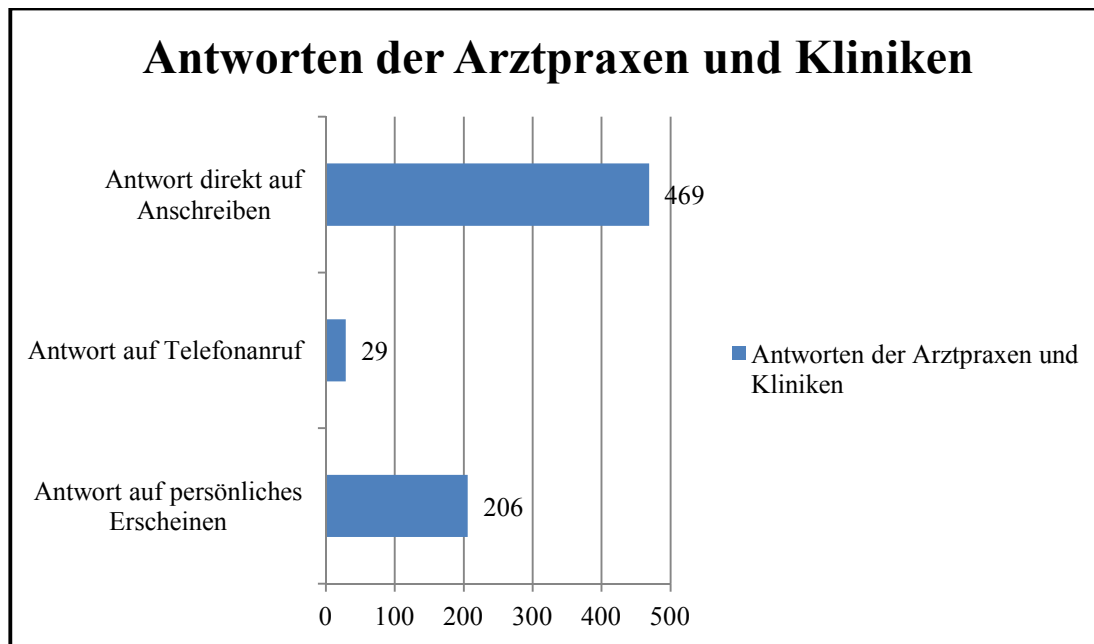
Die teilnehmenden Kliniken und Arztpraxen stammen aus dem gesamten Bundesgebiet (Abbildung 5), zudem beteiligten sich auch zwei Kliniken aus der Schweiz.



**Abbildung 5:** Verteilung der Arztpraxen u. Krankenhäuser in Deutschland

## 2.4 Datenauswertung

Bei 704 Patienten von 1511 ausgewerteten Patientendaten (47,0%) erfolgte eine Rücksendung der ausgefüllten Fragebögen bzw. eine Zusendung der Arztbriefe durch die Arztpraxen und Kliniken. 469 (66,6%) Antworten erfolgten direkt auf das Anschreiben hin. Meldeten sich die Kliniken oder Arztpraxen nicht auf das Anschreiben, wurden sie telefonisch erneut um Zusendung der Arztbriefe gebeten, wodurch 29 Antworten (4,1%) hinzukamen. Drei Kliniken / Arztpraxen wurden persönlich besucht, wodurch weitere 206 Antworten gewonnen werden konnten (29,3%) (Abbildung 6).



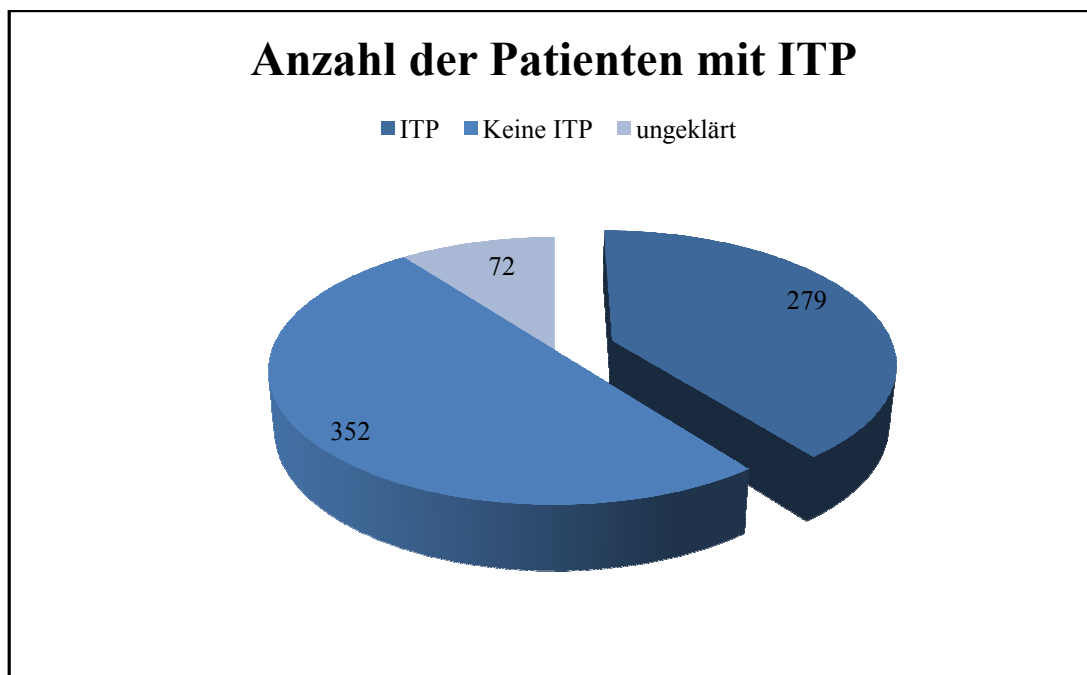
**Abbildung 6:** Antwortwege der Arztpraxen und Kliniken

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem PC-Programm Excel 2007 (Microsoft), dem Chi-Quadrat-Test und dem Mann-Whitney-U-Test.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Anzahl der ITP-Patienten

Von den 703 ausgewerteten Fragebögen bzw. Arztbriefen wurde bei 279 Patienten (39,7%) eine ITP registriert. 352 Patienten (50,1%) litten hingegen unter einer anderen Erkrankung, bei 72 Patienten (10,2%) konnte nicht sicher geklärt werden, ob eine ITP vorliegt (Abbildung 7).



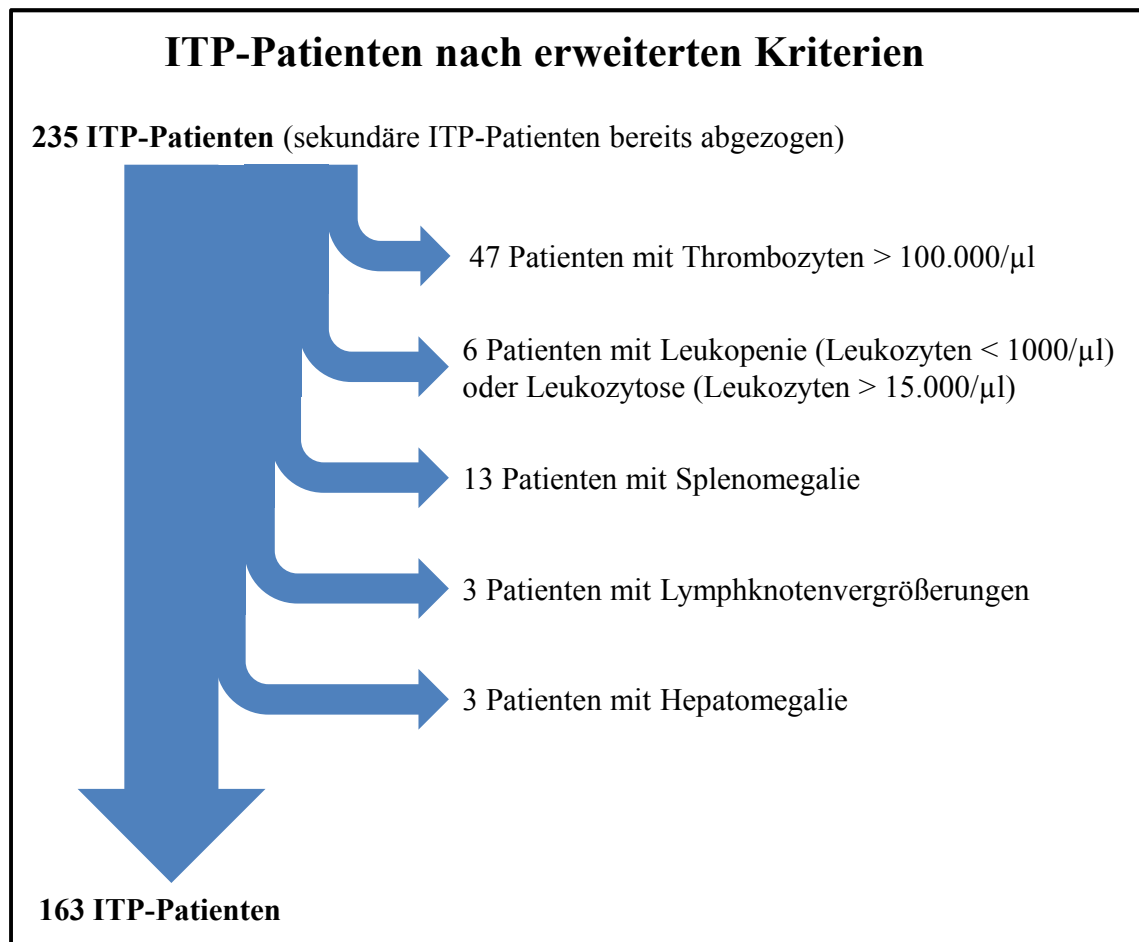
**Abbildung 7:** Anzahl der ITP-Patienten

Von den 279 Patienten, bei denen Ärzte eine ITP diagnostizierten, lag bei 235 Patienten (84,2%) eine (idiopathische) ITP vor, bei 44 Patienten (15,8%) wurde eine sekundäre ITP im Rahmen einer anderen Grunderkrankung festgestellt.

## **3.2 Allgemeine Daten der Patienten mit (idiopathischer) ITP**

### **3.2.1 Kollektiv der ITP-Patienten**

Insgesamt wiesen 235 Patienten laut den ärztlicherseits gestellten Diagnosen eine idiopathische ITP auf. Da bei ITP-Patienten eine Thrombozytopenie im Blutbild beobachtet wird, wurde jene von den 235 ITP-Patienten ausgeschlossen, die Thrombozytenzahlen über 100.000/ $\mu$ l im Blutbild aufwiesen. Somit fielen 47 der 235 ITP-Patienten aus der Wertung. Weitere sechs Patienten wurden ausgeschlossen, da bei ihnen im Blutbild eine Leukopenie (Leukozyten < 1.000/ $\mu$ l) oder eine Leukozytose (Leukozyten > 15.000/ $\mu$ l) festzustellen war, bei ITP-Patienten werden hingegen normale Leukozytenzahlen erwartet. Die Erythrozytenzahlen befinden sich bei ITP-Patienten ebenfalls meist im Normbereich, können aber im Rahmen einer symptomatischen Blutung bei erniedrigten Thrombozytenzahlen abfallen, so dass erniedrigte Erythrozytenzahlen bei ITP-Patienten kein Ausschlusskriterium darstellen. Jedoch wurden jene Patienten ausgeschlossen, die bei der klinischen Untersuchung eine Splenomegalie (13 Patienten), Lymphknotenvergrößerungen (drei Patienten) oder eine Hepatomegalie aufwiesen (drei Patienten); alle drei Veränderungen sind bei ITP-Patienten unwahrscheinlich. Nach den oben genannten Ausschlusskriterien konnten 163 ITP-Patienten mit einer Thrombopenie sowie unauffälligen Leukozytenzahlen und unauffälliger klinischer Untersuchung gezählt werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Ausschlusskriterien bei ITP-Patienten

### 3.2.2 Alter und Geschlecht von ITP-Patienten

Das Kollektiv der 163 ITP-Patienten setzte sich zusammen aus 140 Erwachsenen ( $\geq$  zehn Jahre) (85,9%) und 23 Kindern ( $<$  zehn Jahre) (14,1%).

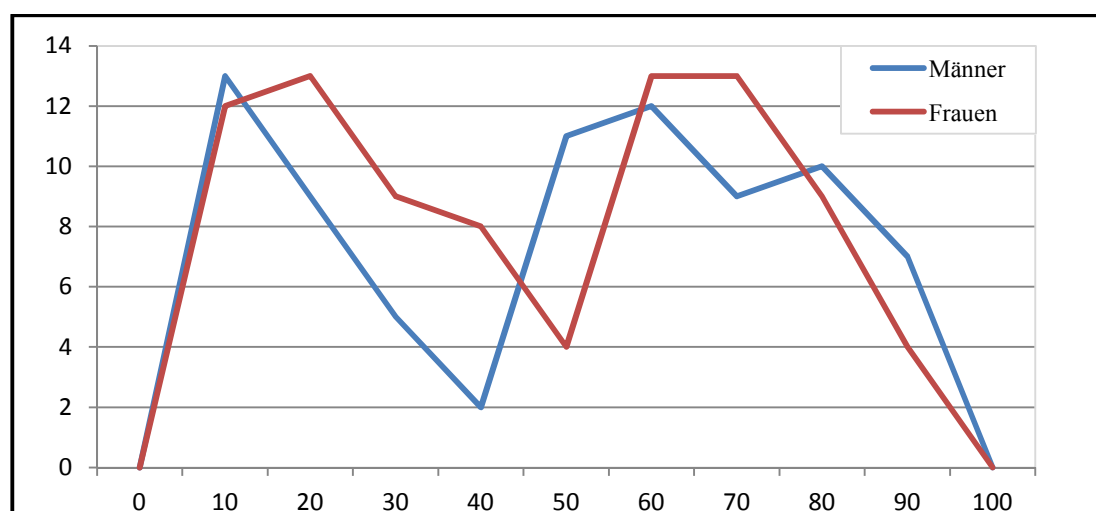
Der Altersmedian der erwachsenen ITP-Patienten lag bei 53 Jahren. 67 Patienten von ihnen waren männlich (47,9%), 73 Patienten waren weiblich (52,1%). Das Alter der männlichen ITP-Patienten  $\geq$  zehn Jahre lag zwischen zehn und 87 Jahren, der Altersmedian betrug 55 Jahre. Das Alter der weiblichen ITP-Patienten  $\geq$  zehn Jahre lag zwischen elf und 85 Jahren, der Altersmedian war mit 52 Jahren geringfügig niedriger als bei den männlichen ITP-Patienten.

Der Altersmedian bei den Kindern ( $<$  zehn Jahre) betrug fünf Jahre. Elf Kinder waren männlich (47,8%), zwölf Kinder waren weiblich (52,2%). Die männlichen ITP-Patienten unter zehn Jahre waren zwischen ein und acht Jahren alt, der Altersmedian betrug sechs Jahre. Das Alter der weiblichen ITP-Patienten unter zehn Jahren lag zwischen einem und neun Jahren, der Altersmedian betrug fünf Jahre (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Alter der ITP-Patienten

	Erwachsene ( $\geq 10$ Jahre)		Kinder ( $< 10$ Jahre)		Gesamt (Kinder und Erwachsene)
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	
<b>Anzahl</b>	140		23		163
	67	73	11	12	
<b>Median [Jahre]</b>	53		5		49
	55	52	6	5	
<b>Minimum [Jahre]</b>	10		1		1
	10	11	1	1	
<b>Maximum [Jahre]</b>	87		9		87
	87	85	8	9	

Häufigkeitsgipfel der ITP konnten zum einen im Kindesalter (bei den männlichen ITP-Patienten Häufigkeitsgipfel bei 10 Jahren, bei den weiblichen ITP-Patienten Häufigkeitsgipfel zwischen 10 und 20 Jahren) und zum anderen im höheren Alter beobachtet werden. Der Anstieg des zweiten Peak erfolgte bei den Männern zehn Jahre früher und endete zehn Jahre früher (Häufigkeitsgipfel 50. – 70. Lebensjahr) als bei den Frauen (Häufigkeitsgipfel 60. – 80. Lebensjahr) (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Altersverteilung bei Patienten mit ITP

### 3.2.3 Laborchemische Angaben von ITP-Patienten

Insgesamt bewegten sich die Thrombozytenzahlen zwischen  $<1000/\mu\text{l}$  und  $99.000/\mu\text{l}$ , der Median lag bei  $39.000/\mu\text{l}$ .

Die Erythrozytenzahlen bei den männlichen ITP-Patienten lagen zwischen  $2.390.000/\mu\text{l}$  und  $6.030.000/\mu\text{l}$ , der Median betrug  $4.660.000/\mu\text{l}$ . Bei den weiblichen ITP-Patienten konnten Erythrozytenzahlen zwischen  $2.840.000/\mu\text{l}$  und  $5.360.000/\mu\text{l}$  dokumentiert werden, der Median lag bei  $4.530.000/\mu\text{l}$ .

Die Leukozytenzahlen der ITP-Patienten rangierten zwischen  $1.200/\mu\text{l}$  und  $13.700/\mu\text{l}$ , der Median der Leukozyten lag bei  $6.100/\mu\text{l}$  (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Thrombozyten-, Erythrozyten- und Leukozytenzahlen bei ITP-Patienten

	Thrombozyten	Erythrozyten		Leukozyten
		männlich	weiblich	
<b>Median</b> [pro $\mu\text{l}$ ]	39.000	4.660.000	4.530.000	6.100
<b>Minimum</b> [pro $\mu\text{l}$ ]	$< 1.000$	2.390.000	2.840.000	1.200
<b>Maximum</b> [pro $\mu\text{l}$ ]	99.000	6.030.000	5.360.000	13.700

Das MPV (durchschnittliches Thrombozytenvolumen) konnte bei 56 ITP-Patienten bestimmt werden. Die Werte des MPVs rangierten dabei zwischen 7,3 fl und 15 fl bei einem Median von 12 fl. Bei 29 Patienten (51,7%) lag das MPV  $\geq 12$  fl und war somit erhöht, bei 27 Patienten (48,2%) zeigte sich das MPV mit unter 12 fl normwertig. Bei den Nicht-ITP-Patienten zeigte sich das MPV hingegen nur bei 26,9% erhöht (66 von 245 Patienten, bei denen das MPV bestimmt werden konnte) bei einem Median von 11,2 fl. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich damit eine signifikante Differenz zwischen ITP- und Nicht-ITP-Patienten (Tabelle 5).



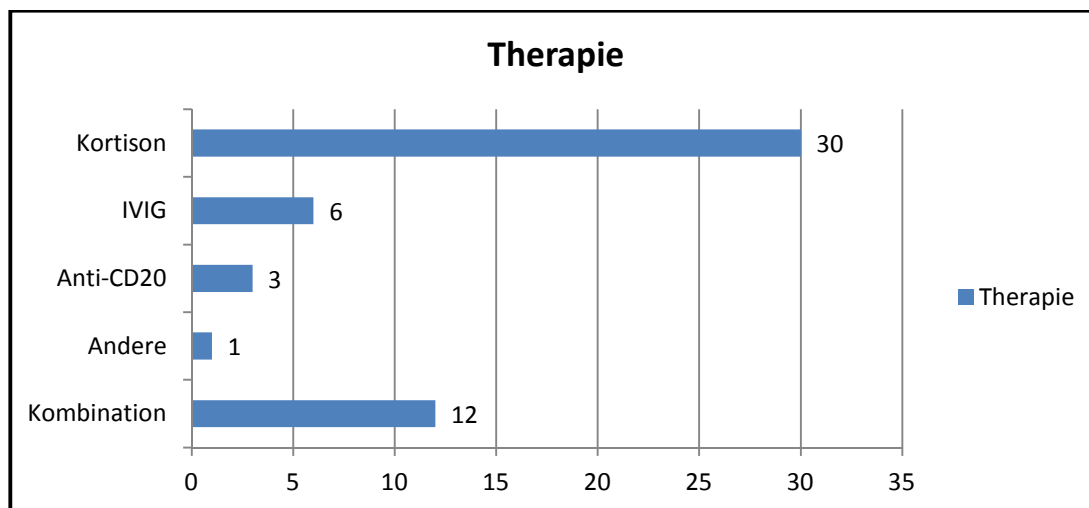
**Tabelle 5:** Erhöhtes MPV bei ITP-Patienten und Nicht-ITP-Patienten

Es besteht eine signifikante Differenz ( $p < 0,01$ , Two Tailed Test).

	MPV ITP-Patienten	MPV Nicht-ITP-Patienten
Median [fl]	12	11,2
Minimum [fl]	7,3	6
Maximum [fl]	15	14,8
MPV erhöht [%]	51,7	26,9

### 3.2.4 Therapieregime bei ITP-Patienten

Eine medikamentöse Therapie wurde bei 52 der 163 Patienten (31,9%) durchgeführt. Der Großteil von ihnen erhielt Kortison (30 Patienten, 57,7%). Sechs Patienten (11,5%) bekamen IVIG (intravenöse Immunglobuline), drei Patienten (5,8%) wurden mit dem monoklonalen Antikörper Anti-CD20 (Rituximab) therapiert. Bei zwölf Patienten (23,1%) wurde eine Kombination mehrerer Medikamente durchgeführt, die entweder aus Kortison und IVIG oder aus Kortison und Rituximab bestand (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Therapieformen bei Patienten mit ITP

### **3.3 Allgemeine Daten der Patienten mit sekundärer ITP**

#### **3.3.1 Kollektiv der Patienten mit sekundärer ITP**

Bei 44 Patienten lag eine sekundäre ITP vor. Hier wurden jene Patienten mit Thrombozytenzahlen  $> 100.000/\mu\text{l}$ , einer Leukopenie oder Leukozytose, Lymphknotenvergrößerungen sowie einer Spleno- oder Hepatomegalie nicht aus der Wertung genommen, da diese Veränderungen im Rahmen der Grunderkrankung auftreten können und damit kein Ausschlusskriterium für eine sekundäre ITP darstellen.

#### **3.3.2 Alter und Geschlecht der Patienten mit sekundärer ITP**

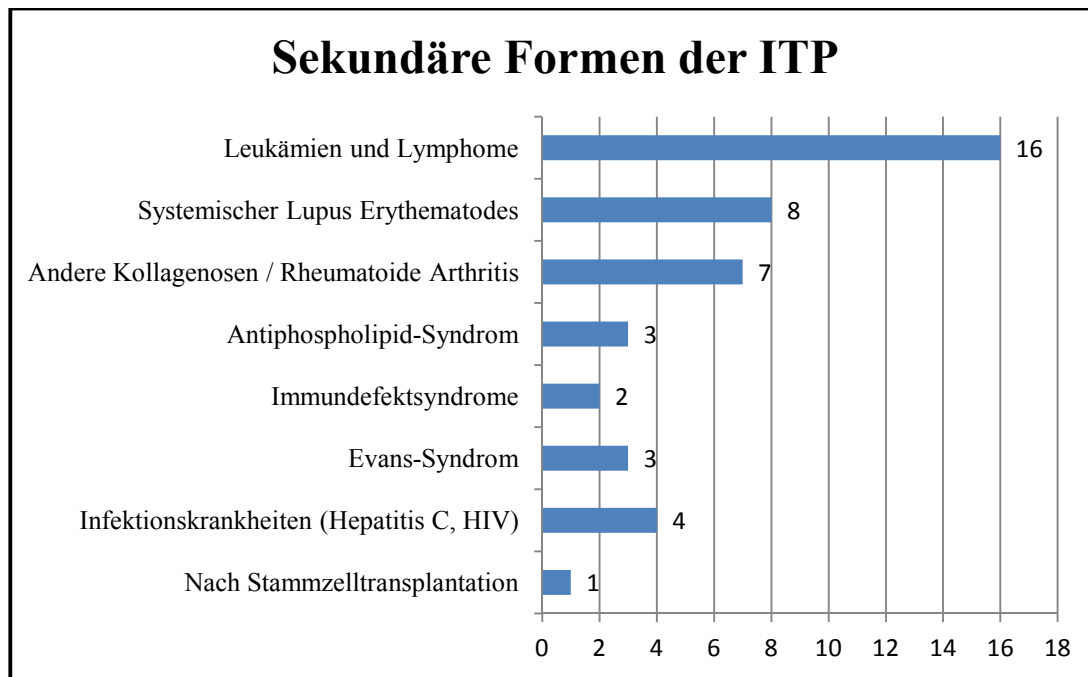
Von den Patienten mit einer sekundären ITP waren 40 Patienten (90,9%)  $\geq$  zehn Jahre alt, bei vier Patienten (9,1%) lag das Alter unter zehn Jahren. Der Altersmedian bei den erwachsenen Patienten lag bei 53 Jahren (weibliche Patienten: 56,5 Jahre, männliche Patienten: 50 Jahre), bei den Kindern ( $< 10$  Jahre) betrug der Altersmedian 5,5 Jahre. Von den Erwachsenen waren 24 Patienten männlich, 16 Patienten waren weiblich. Bei den Kindern waren ein weiblicher Patient und drei männliche Patienten mit sekundärer ITP zu registrieren (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Alter der Patienten mit sekundärer ITP

	<b>Erwachsene (<math>\geq 10</math> Jahre)</b>		<b>Kinder (<math>&lt; 10</math> Jahre)</b>		<b>Gesamt (Kinder und Erwachsene)</b>
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	
<b>Anzahl</b>	40		4		44
	24	16	3	1	
<b>Median [Jahre]</b>	53		5,5		50,5
	50	56,5	6	5	
<b>Minimum [Jahre]</b>	13		5		5
	13	13	5	5	
<b>Maximum [Jahre]</b>	82		7		82
	82	77	7	5	

### 3.3.3 Grunderkrankungen bei den sekundären ITP-Patienten

Bei den sekundären Formen litten 16 Patienten (36,4%) unter einer B-CLL, einem Non-Hodgkin-Lymphom oder einem Morbus Hodgkin. Acht Patienten (18,2%) wiesen einen systemischen Lupus erythematodes auf, bei sieben Patienten (15,9%) wurden andere Kollagenosen bzw. eine rheumatoide Arthritis registriert. Drei Patienten (6,8%) wiesen ein Antiphospholipidsyndrom auf. Bei zwei Patienten (4,5%) wurde als primäre Erkrankung ein Immundefektsyndrom diagnostiziert. Weitere drei Patienten (6,8%) litten unter dem Evans-Syndrom, d.h. einer ITP mit kombinierter Autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA). Bei vier Patienten (9,1%) lag eine Infektionskrankheit (Hepatitis C, HIV) zugrunde. Ein Patient (2,3%) wies eine sekundäre ITP nach Stammzelltransplantation auf (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Grunderkrankungen bei Patienten mit Sekundärer ITP

### 3.4 Direkter Antikörpernachweis der Patienten mit (idiopathischer) ITP

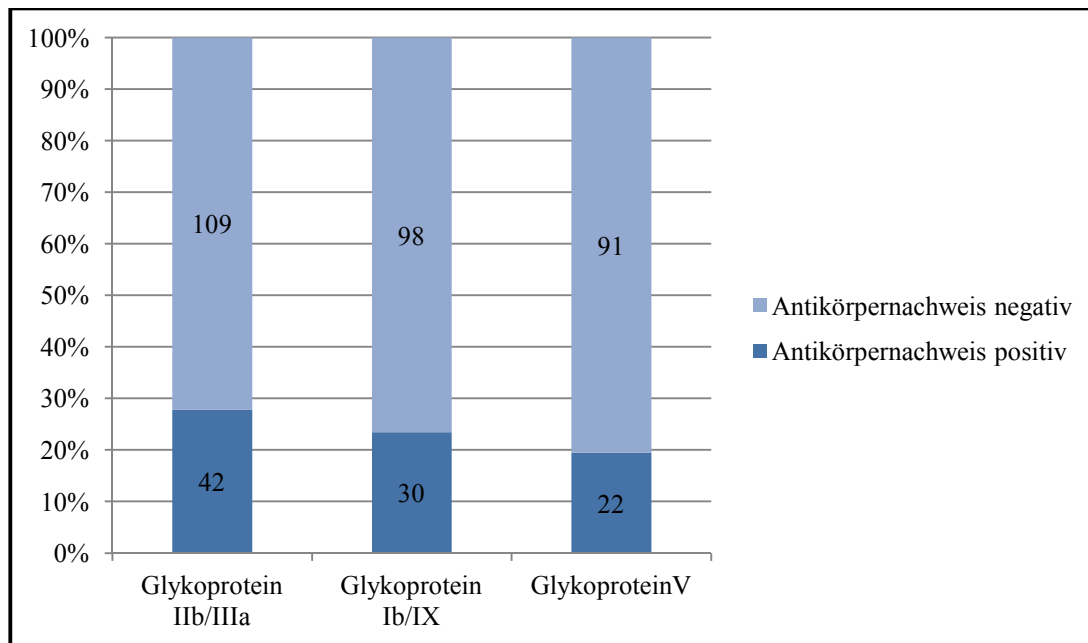
#### 3.4.1 Antikörpernachweis im direkten MAIPA

Nicht bei allen ITP-Patienten war genügend Material vorhanden, um Antikörper gegen die Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und V zu untersuchen. Das Material der eingesendeten Blutprobe wurde zunächst stets genutzt, um den Antikörpernachweis gegen GP IIb/IIIa durchzuführen. Bei noch genügendem Restmaterial wurde als Nächstes der Antikörpernachweis gegen GP Ib/IX durchgeführt. Blieb dann noch genügend Material übrig, konnte der Antikörpernachweis gegen GP V erfolgen.

Der direkte MAIPA gegen GP IIb/IIIa konnte bei 151 der 163 ITP-Patienten (92,6%) durchgeführt werden. Antikörper gegen GP Ib/IX konnten mittels direktem MAIPA bei 128 Patienten der 163 ITP-Patienten (78,5%) untersucht werden. Ein Test auf Antikörper gegen Glykoprotein V erfolgte bei 113 Patienten der 163 ITP-Patienten (69,3%).

Ein positiver Antikörpernachweis gegen mindestens eines der drei Glykoproteine gelang bei 52 jener 151 ITP-Patienten, bei denen mindestens ein Glykoprotein im direkten MAIPA untersucht werden konnte (34,3%).

Antikörper gegen GP IIb/IIIa waren bei 42 von 151 ITP-Patienten (27,8%) nachweisbar. Ein positiver Antikörperrnachweis gegen GP Ib/IX zeigte sich bei 30 von 128 ITP-Patienten (23,4%). Antikörper gegen GP V konnten bei 22 von 113 ITP-Patienten (19,5%) gefunden werden (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Antikörperrnachweis bei Patienten mit ITP

### 3.4.2 Antikörperrverteilung im direkten MAIPA

Ein positiver Antikörperrnachweis im direkten MAIPA war bei 34 Patienten jener 113 ITP-Patienten, bei denen alle drei Glykoproteine getestet wurden, zu verzeichnen. 70,6% der Patienten (24 von 34 Patienten) wiesen Antikörper gegen GP IIb/IIIa auf, bei 73,6% der Patienten (25 von 34 Patienten) ließen sich Antikörper gegen GP Ib/IX nachweisen, ein Antikörperrnachweis gegen GP V gelang bei 64,7% der Patienten (22 von 34 Patienten).

Bei elf von den 34 Patienten (32,4%) konnten Antikörper gegen nur ein Glykoprotein nachgewiesen werden. Am häufigsten war der isolierte Antikörperrnachweis gegen Glykoprotein IIb/IIIa positiv (sieben ITP-Patienten, 20,6%). Ein positiver isolierter Antikörperrnachweis gegen Glykoprotein Ib/IX war bei drei Patienten (8,8%) zu verzeichnen. Ein Patient (2,9%) wies isoliert Antikörper gegen Glykoprotein V auf. Bei 23 Patienten (67,7%) waren Antikörper gegen mehrere Glykoproteine nachweisbar. Der größte Teil entfiel auf einen positiven Antikörperrnachweis gegen alle drei Glykoproteine (14 ITP-Patienten, 41,2%). Eine Kombination von Antikörpern gegen

GP IIb/IIIa und GP Ib/IX war bei zwei Patienten (5,9%) zu verzeichnen. Ein Patient (2,9%) wies Antikörper gegen GP IIb/IIIa und GP V auf. Bei sechs Patienten (41,2%) war eine Kombination von Antikörpern gegen GP Ib/IX und GP V nachzuweisen (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Antikörperverteilung mit durchgeführten AK-Tests gegen alle drei Glykoproteine

	<b>Antikörper positiv</b>	<b>Prozent</b>
Isolierter AK-Nachweis gegen ein Glykoprotein	11	32,4%
AK gegen GP IIb/IIIa	7	20,6%
AK gegen GP Ib/IX	3	8,8%
AK gegen GP V	1	2,9%
AK-Nachweis gegen mehrere Glykoproteine	23	67,6%
AK gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX	2	5,9%
AK gegen GP IIb/IIIa und GP V	1	2,9%
AK gegen GP Ib/IX und GP V	6	17,6%
AK gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V	14	41,2%
<b>Gesamt</b>	<b>34</b>	<b>100%</b>

Um die hier erhobenen Ergebnisse mit anderen Studien vergleichen zu können, in denen der Antikörpernachweis gegen GP V nicht durchgeführt wurde, wurde zudem berechnet, bei wie vielen Patienten mit positivem Antikörpernachweis im direkten MAIPA ein Nachweis ausschließlich gegen die Glykoproteine IIb/IIIa und Ib/IX gelang. Von insgesamt 40 ITP-Patienten, bei denen Tests gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX durchgeführt und mindestens ein Antikörper nachgewiesen werden konnte, wiesen 31 Patienten Antikörper (77,5%) gegen GP IIb/IIIa auf; bei zehn dieser Patienten (25,0%) war ein isolierter Antikörpernachweis gegen GP IIb/IIIa zu verzeichnen und bei 21 Patienten (52,5%) war eine Kombination von Antikörpern gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX zu beobachten. Bei 30 Patienten (75,0%) waren Antikörper gegen GP Ib/IX nachweisbar, neun Patienten (22,5%) zeigten einen isolierten Antikörpernachweis gegen GP Ib/IX (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Antikörperverteilung bei Patienten mit ITP ohne GP V

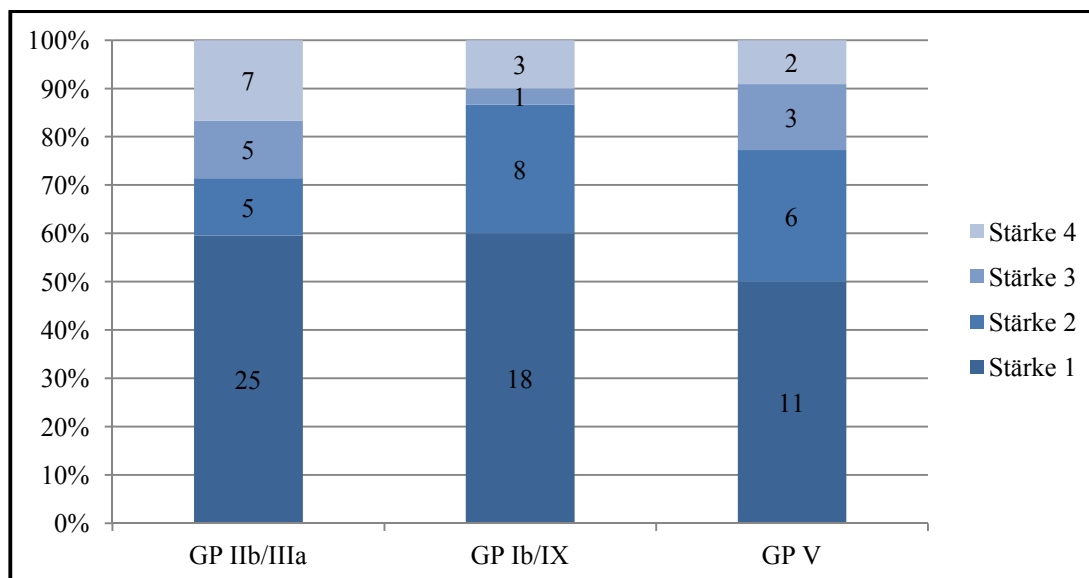
	Antikörper positiv	Prozent
AK gegen GP IIb/IIIa	10	25,0%
AK gegen GP Ib/IX	9	22,5%
AK gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX	21	52,5%
<b>Gesamt</b>	<b>40</b>	<b>100%</b>

### 3.4.3 Stärke der Antikörperreaktion im direkten MAIPA

Die Stärke der Reaktion im MAIPA wird in Zahlen protokolliert. Die Zahlen 1 und 2 stehen für eine schwache Reaktion, die Zahlen 3 und 4 für eine starke Reaktion. Gegen das Glykoprotein IIb/IIIa konnten bei 42 Patienten Antikörper nachgewiesen werden, dabei zeigte sich bei 30 Patienten (71,4%) der Antikörnernachweis schwach positiv, eine starke Reaktion war bei 12 Patienten (28,6%) zu verzeichnen.

30 Patienten wiesen Antikörper gegen das Glykoprotein Ib/IX auf, davon war die Reaktion bei 26 Patienten (86,7%) schwach positiv und bei 4 Patienten (13,3%) stark positiv.

Bei 22 Patienten gelang ein Nachweis von Antikörpern gegen das Glykoprotein V, dabei ergab der Antikörnernachweis bei 17 Patienten (77,3%) eine schwach positive Reaktion und bei 5 Patienten (22,7%) eine stark positiv Reaktion (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Stärke des Antikörnernachweises im direkten MAIPA

### 3.5 Direkter Antikörperrnachweis bei Patienten mit sekundärer ITP

#### 3.5.1 Antikörperrnachweis im direkten MAIPA

Ein Test auf Antikörper mittels direktem MAIPA gegen Glykoprotein IIb/IIIa erfolgte bei 43 Patienten der 44 Patienten mit sekundärer ITP (97,7%). Der direkte MAIPA gegen GP Ib/IX konnte bei 36 der 44 ITP-Patienten (81,8%) durchgeführt werden. Antikörper gegen GP V konnten bei 30 Patienten der 44 ITP-Patienten (68,2%) untersucht werden.

Ein positiver Antikörperrnachweis gegen GP IIb/IIIa gelang bei 17 von 43 Patienten (39,5%). Antikörper gegen GP Ib/IX ließen sich bei 15 von 36 Patienten (41,7%) nachweisen. Zehn von 30 Patienten (33,3%) zeigten Antikörper gegen GP V (Abbildung 14).

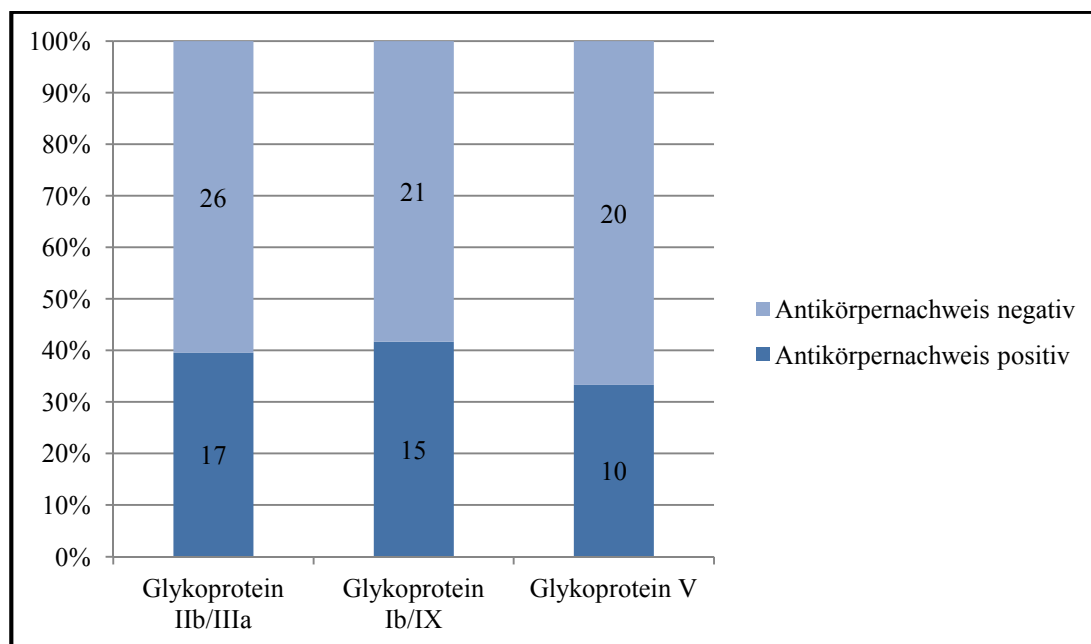


Abbildung 14: Antikörperrnachweis bei Patienten mit sekundärer ITP

#### 3.5.2 Antikörperrverteilung im direkten MAIPA

Ein positiver Antikörperrnachweis gegen mindestens eines der drei Glykoproteine gelang bei 17 jener 30 Patienten, bei denen Antikörpertests gegen alle drei Glykoproteine durchgeführt werden konnten (56,7%). Von diesen 17 Patienten wiesen zehn Patienten (58,8%) Antikörper gegen GP IIb/IIIa auf, bei elf Patienten (64,7%)



zeigten sich Antikörper gegen GP Ib/IX und bei zehn Patienten (58,8%) war ein positiver Antikörperrnachweis gegen GP V zu verzeichnen.

Bei acht von diesen 17 Patienten (47,0%) wurden Antikörper gegen nur ein Glykoprotein nachgewiesen. Bei zwei Patienten (11,8%) war ausschließlich der Antikörperrnachweis gegen GP IIb/IIIa positiv, vier Patienten (23,4%) wiesen isoliert Antikörper gegen GP Ib/IX auf und bei zwei Patienten (11,8%) konnten Antikörper nur gegen GP V verzeichnet werden. Bei neun der 17 Patienten mit sekundärer ITP und positivem Antikörperrnachweis (53,0%) waren Antikörper gegen mehrere Glykoproteine nachzuweisen. Dabei wiesen fünf Patienten Antikörper (29,4%) gegen alle drei Glykoproteine auf (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Antikörperverteilung bei Patienten mit sekundärer ITP

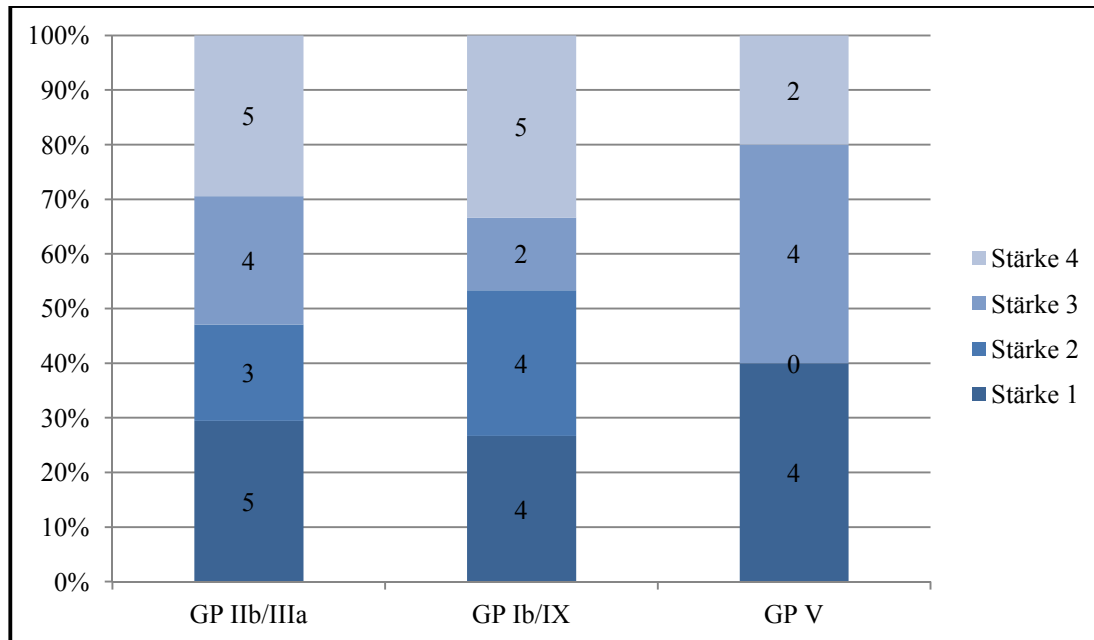
	<b>Antikörper positiv</b>	<b>Prozent</b>
Isolierter AK-Nachweis gegen ein Glykoprotein	8	47,0%
AK gegen GP IIb/IIIa	2	11,8%
AK gegen GP Ib/IX	4	23,4%
AK gegen GP V	2	11,8%
AK-Nachweis gegen mehrere Glykoproteine	9	53,0%
AK gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX	1	5,9%
AK gegen GP IIb/IIIa und GP V	2	11,8%
AK gegen GP Ib/IX und GP V	1	5,9%
AK gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V	5	29,4%
<b>Gesamt</b>	<b>17</b>	<b>100%</b>

### **3.5.3 Stärke der Antikörperreaktion im direkten MAIPA**

Antikörper gegen GP IIb/IIIa zeigten sich bei 17 Patienten, dabei ergab der Antikörperrnachweis bei acht Patienten (47,1%) eine schwach positive Reaktion und bei neun Patienten (52,9%) eine stark positive Reaktion.

Gegen GP Ib/IX wurden bei 15 Patienten Antikörper nachgewiesen, dabei zeigte sich bei acht Patienten (53,3%) der Antikörperrnachweis schwach positiv, eine starke Reaktion war bei sieben Patienten (46,7%) zu verzeichnen.

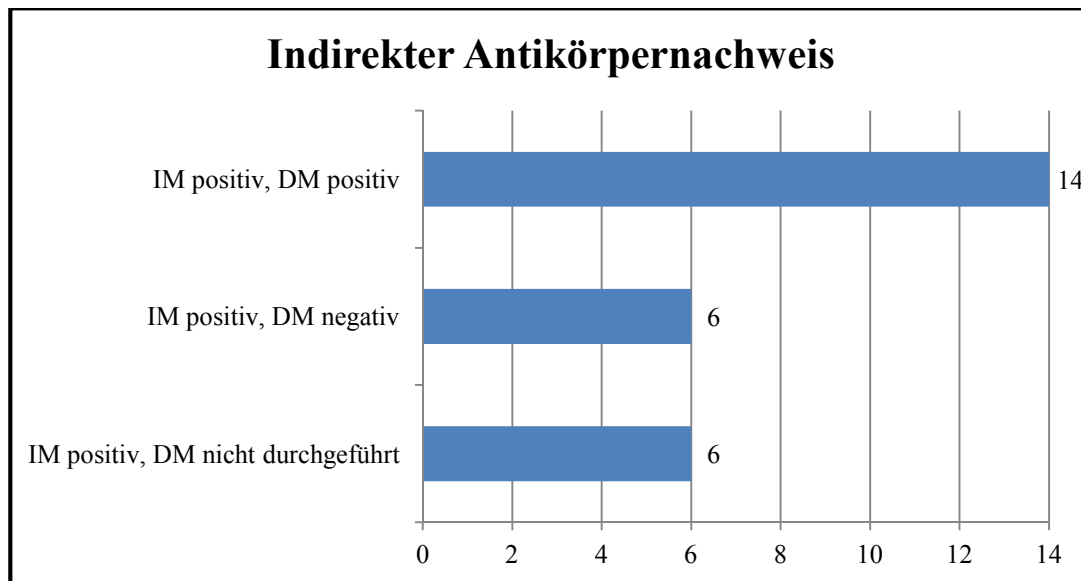
Ein positiver Antikörpernachweis gegen GP V gelang bei zehn Patienten. Bei vier Patienten (40,0%) zeigte sich eine schwache Reaktion, sechs Patienten (60,0%) wiesen eine starke Reaktion auf (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Stärke d. Antikörpernachweises im direkten MAIPA bei sekundärer ITP

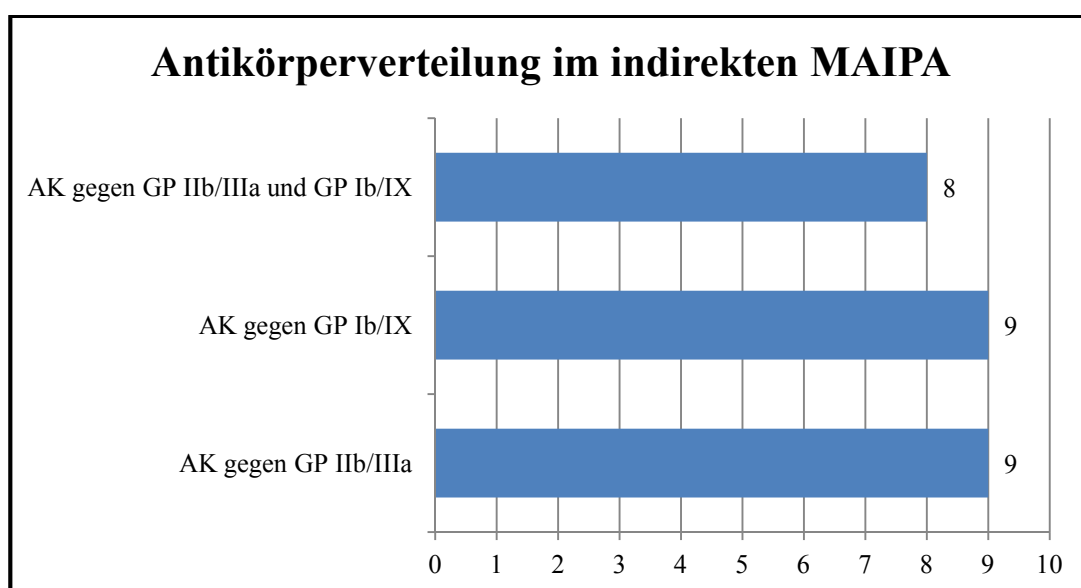
### 3.6 Indirekter Antikörpernachweis bei ITP-Patienten (idiopathisch und sekundär)

Für die Berechnung des indirekten MAIPAs wurden die Patienten mit ITP und sekundärer ITP aufgrund der geringen Fallzahl zusammengefasst. Der indirekte MAIPA wurde bei 52 der 207 ITP-Patienten mit ITP oder sekundärer ITP (25,1%) durchgeführt, dabei waren bei 26 Patienten (50,0%) Antikörper nachweisbar. Von diesen 26 Patienten war der indirekte Antikörpernachweis vor allem bei jenen Patienten positiv, bei denen bereits im direkten MAIPA Antikörper nachgewiesen werden konnten (14 von 26 Patienten, 53,8%). Bei sechs Patienten (23,1%) war ein positiver indirekter Antikörpernachweis zu verzeichnen bei gleichzeitig negativem direkten MAIPA. Sechs ITP-Patienten (23,1%) wiesen Antikörper im indirekten MAIPA auf bei nicht durchgeführtem direkten MAIPA (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Indirekter Antikörperrnachweis  
(DM =direkter MAIPA, IM =indirekter MAIPA)

Der indirekte Antikörperrnachweis wurde ausschließlich gegen die Glykoproteine IIb/IIIa und Ib/IX durchgeführt, Antikörper gegen Glykoprotein V wurden nicht gemessen. Bei den Patienten mit positivem indirekten Antikörperrnachweis entfielen etwa gleich große Anteile auf den isolierten Nachweis von Antikörpern gegen Glykoprotein IIb/IIIa (neun Patienten, 34,6%), isoliert Antikörper gegen Glykoprotein Ib/IX (neun Patienten, 34,6%) bzw. Antikörper gegen beide Glykoproteine (acht Patienten, 30,8%) (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Antikörperrverteilung im indirekten MAIPA

### 3.7 Faktoren im Rahmen eines positiven Antikörpernachweises

Bei der Untersuchung des Einflusses von patientenbezogenen Daten auf den Nachweis von Antikörpern hatten das Geschlecht und das Alter (Erwachsene oder Kinder) im Chi-Quadrat-Test keinen Einfluss auf den Antikörpernachweis. Einen signifikanten Einfluss im Chi-Quadrat-Test hingegen zeigte sich bei der Form der ITP auf den positiven Antikörpernachweis. Bei Patienten mit einer (idiopathischen) ITP konnten Antikörper in 34,4% (52 von 151 Patienten) nachgewiesen werden, bei Patienten mit sekundärer ITP gelang der Nachweis in 58,1% (25 von 43 Patienten). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer sekundären ITP signifikant häufiger detektierbare Antikörper aufweisen als Patienten mit einer idiopathischen ITP.

**Tabelle 10:** Form der ITP und Antikörpernachweis

Der Zusammenhang ist signifikant ( $\alpha = 0,05$ ; Chi-Quadrat = 7,8489;  $p = 0,0051$ ).

Form der ITP	AK-Nachweis positiv	AK-Nachweis negativ	Gesamt
Idiopathisch	52	99	151
Sekundär	25	18	43
<b>Gesamt</b>	<b>77</b>	<b>117</b>	<b>194</b>

**Tabelle 11:** Alter und Antikörpernachweis

Der Zusammenhang ist nicht signifikant ( $\alpha = 0,05$ ; Chi-Quadrat = 0,1624;  $p = 0,687$ ).

Alter	AK-Nachweis positiv	AK-Nachweis negativ	Gesamt
< 10 Jahre	9	16	25
$\geq 10$ Jahre	68	101	169
<b>Gesamt</b>	<b>77</b>	<b>117</b>	<b>194</b>

**Tabelle 12:** Geschlecht und Antikörnernachweis

Der Zusammenhang ist nicht signifikant ( $\alpha = 0,05$ ; Chi-Quadrat = 1,13103;  $p = 0,25$ ).

<b>Geschlecht</b>	<b>AK-Nachweis positiv</b>	<b>AK-Nachweis negativ</b>	<b>Gesamt</b>
Männlich	42	54	96
Weiblich	35	63	98
<b>Gesamt</b>	<b>77</b>	<b>117</b>	<b>194</b>

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Thrombozytenzahl und die Höhe des MPV bei Patienten mit positivem Antikörnernachweis von denen mit negativem Antikörnernachweis signifikant unterscheiden (hier wurden Patienten mit sekundärer ITP aus der Wertung genommen, da die der sekundären ITP zugrunde liegenden Erkrankungen die Anzahl der Thrombozyten und die Höhe des MPVs verfälschen könnten). Bei Patienten mit positivem Antikörnernachweis lag der Median der Thrombozytenzahl bei 30.000/ $\mu$ l, bei Patienten mit negativem Antikörnernachweis betrug der Median der Thrombozytenzahl 42.000/ $\mu$ l, die Differenz zeigte sich signifikant im Mann-Whitney-U-Test.

**Tabelle 13:** Thrombozytenzahl und Antikörnernachweis

Es besteht eine signifikante Differenz ( $p < 0,05$ , Two Tailed Test).

<b>Thrombozyten</b>	<b>AK-Nachweis positiv</b>	<b>AK-Nachweis negativ</b>
Median [ $\mu$ l]	30.000	42.000

Der Median des MPV lag bei den Patienten mit positivem Antikörnernachweis bei 13,1 fl, Patienten mit negativem Antikörnernachweis wiesen einen Median des MPV von 11,7 fl auf. Bei 80% der Patienten mit positivem Antikörnernachweis war das MPV mit  $\geq 12$  fl erhöht, bei den Patienten mit negativem Antikörnernachweis wiesen hingegen nur 41,5% ein erhöhtes MPV auf. Es zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen ITP-Patienten mit positivem Antikörnernachweis und ITP-Patienten mit negativem Antikörnernachweis im Mann-Whitney-U-Test. Somit kann konstatiert werden, dass Patienten mit positivem Antikörnernachweis eine niedrigere Anzahl an Thrombozyten und ein höheres MPV aufweisen als Patienten mit negativem Antikörnernachweis.

**Tabelle 14:** MPV und Antikörpernachweis

Es besteht eine signifikante Differenz ( $p < 0,05$ , Two Tailed Test).

MPV	AK-Nachweis positiv	AK-Nachweis negativ
Median [fl]	13,1	11,7
MPV erhöht [%]	80,0	41,5

## 3.8 Sensitivität und Spezifität

### 3.8.1 Sensitivität und Spezifität ohne Einbeziehung von Antikörpern gegen GP V

Für die Berechnung der Sensitivität und der Spezifität wurden die Patienten mit einer ITP und sekundärer ITP im Rahmen einer anderen Grunderkrankung zusammengefasst. Dabei wurden nur jene Patienten mit in die Wertung genommen, bei denen der direkte Antikörpernachweis gegen mindestens ein Glykoprotein durchgeführt wurde. Patienten mit positivem indirekten Antikörpernachweis wurden nicht berücksichtigt, da bei diesen Patienten kein Antikörpernachweis gegen Glykoprotein V erfolgte. Insgesamt konnten somit 194 ITP-Patienten mit in die Wertung genommen werden (151 ITP-Patienten, 43 Patienten mit sekundärer ITP).

Ein Antikörpernachweis gegen GP IIb/IIIa war bei 66 Patienten zu verzeichnen, so dass sich eine Sensitivität von 34,0% (Konfidenzintervall 27,4% bis 40,7%) ergibt. 346 Patienten aus dem Kollektiv wiesen laut den Arztbriefen keine ITP auf, ein positiver Antikörpernachweis war dennoch bei zwei Patienten zu vermerken (ein Patient mit Myelodysplastischem Syndrom, ein Patient mit hämophagozytärer Lymphohistiozytose). Folglich liegt die Spezifität bei 99,4% (Konfidenzintervall 98,6% bis 100%). Der positive prädiktive Wert beträgt 97,1% (Konfidenzintervall 93,0 bis 100%).

**Tabelle 15:** AK-Nachweis gegen GP IIb/IIIa

	<b>AK-Nachweis positiv</b>	<b>AK-Nachweis negativ</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Patienten mit ITP</b>	66	128	194
<b>Patienten ohne ITP</b>	2	344	346
<b>Gesamt</b>	<b>68</b>	<b>472</b>	<b>540</b>

Unter Einbeziehung der Patienten mit Antikörpernachweis gegen GP Ib/IX stieg die Anzahl der Patienten von 66 auf 74, so dass sich eine Sensitivität von 38,1% (Konfidenzintervall 31,3% bis 45,0%) berechnet. Die Spezifität liegt unverändert bei 99,4% (Konfidenzintervall 98,6% bis 100%). Der positive prädiktive Wert steigt auf 97,4% (Konfidenzintervall 93,8% bis 100%).

**Tabelle 16:** AK-Nachweis gegen GP IIb/IIIa & GP Ib/IX

	AK-Nachweis positiv	AK-Nachweis negativ	Gesamt
Patienten mit ITP	74	120	194
Patienten ohne ITP	2	344	346
<b>Gesamt</b>	<b>76</b>	<b>464</b>	<b>540</b>

### 3.8.2 Sensitivität und Spezifität unter Einbeziehung von Antikörpern gegen GP V

Bezieht man den Antikörpernachweis gegen Glykoprotein V mit in die Auswertung ein, so steigt die Anzahl der Patienten mit positivem Antikörpernachweis von 74 auf 77, die Sensitivität verbessert sich somit von 38,1% auf 39,7% (Konfidenzintervall 32,8% bis 46,6%). Die Spezifität liegt unverändert bei 99,4% (Konfidenzintervall 98,6% bis 100%), der positive prädiktive Wert steigt leicht auf 97,5% (Konfidenzintervall 94,0% bis 100%).

**Tabelle 17:** AK-Nachweis gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX & GP V

	AK-Nachweis positiv	AK-Nachweis negativ	Gesamt
Patienten mit ITP	77	117	194
Patienten ohne ITP	2	344	346
<b>Gesamt</b>	<b>79</b>	<b>461</b>	<b>540</b>

**Tabelle 18:** Sensitivität, Spezifität und Positiver Prädiktiver Wert

	Antikörpernachweis gegen GP IIb/IIIa	Antikörpernachweis gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX	Antikörpernachweis gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V
Sensitivität	34,0% (KI 27,4% bis 40,7%)	38,1% (KI 31,3% bis 45,0%)	39,7% (KI 32,8% bis 46,6%)
Spezifität	99,4% (KI 98,6% bis 100%)	99,4% (KI 98,6% bis 100%)	99,4% (KI 98,6% bis 100%)
Positiver Prädiktiver Wert	97,1% (KI 93,0% bis 100%)	97,4% (KI 93,8% bis 100%)	97,5% (KI 94,0% bis 100%)



## 4 Diskussion

### 4.1 Charakteristika der ITP-Patienten

Das Verhältnis von Frauen und Männern über 10 Jahre beträgt in dieser Studie 1,1:1 (73 Frauen, 67 Männer). Auch in der Literatur ist ein Überhang an Frauen bei Patienten mit einer ITP zu beobachten, das Verhältnis ist mit 1,2-1,7:1 etwas ausgeprägter (Neylon et al. 2003, Frederiksen et al. 1999). Bei ITP-Patienten unter 10 Jahre sind weibliche ITP-Patienten mit einem Verhältnis von 1,1:1 in dieser Studie häufiger betroffen als männliche ITP-Patienten; in der Literatur wird beschrieben, dass die Geschlechter bei kindlichen ITP-Patienten in etwa gleich häufig betroffen sind (Cines et al. 2000).

In der vorliegenden Studie können zwei Häufigkeitsgipfel bei ITP-Patienten beobachtet werden: Ein Peak liegt im Kindesalter, die Literatur beschreibt dazu eine Inzidenz von bis zu 5/100.000 (Terrell et al. 2010). Der andere Gipfel ist im höheren Lebensalter mit einem Median von 53 Jahren zu verzeichnen. Diese Beobachtungen stimmen in etwa mit einer bisherigen Studie überein, bei der der Median von erwachsenen ITP-Patienten 56 Jahre beträgt (Frederiksen et al. 1999).

Das Blutbild von ITP-Patienten weist laut der Literatur eine meist isolierte Thrombozytopenie auf, während Leukozyten und Erythrozyten im Normbereich liegen. Diese Angaben werden in dieser Studie bestätigt. Die Thrombozytenzahlen bei den idiopathischen ITP-Patienten liegen zwischen  $< 1000/\mu\text{l}$  und  $99.000/\mu\text{l}$ , der Median beträgt  $39.000/\mu\text{l}$ . Die Leukozytenzahlen rangieren zwischen  $1.200/\mu\text{l}$  und  $13.700/\mu\text{l}$ , der Median liegt bei  $6.100/\mu\text{l}$ . Die Erythrozytenzahlen bei den Männern liegen zwischen  $2,39 \text{ M}/\mu\text{l}$  und  $4,66 \text{ M}/\mu\text{l}$  mit einem Median von  $4,66 \text{ M}/\mu\text{l}$ , bei den Frauen rangieren die Erythrozytenzahlen zwischen  $2,84 \text{ M}/\mu\text{l}$  und  $5,35 \text{ M}/\mu\text{l}$  mit einem Median von  $4,53 \text{ M}/\mu\text{l}$ . Weiterhin beschreibt die Literatur ein oft erhöhtes MPV (mittleres Thrombozytenvolumen) bei ITP-Patienten. Dies bestätigt sich in dieser Studie mit einem erhöhten MPV bei 51,8% der ITP-Patienten, während die Nicht-ITP-Patienten nur zu 24,5% ein erhöhtes MPV aufweisen, womit eine signifikante Differenz berechnet werden konnte.

## **4.2 Antikörpernachweis gegen die Glykoproteine IIb/IIIa und Ib/IX**

Die Glykoproteine IIb/IIIa und Ib/IX sind die bislang wichtigsten identifizierten Zielantigene, gegen die Antikörper im Rahmen einer ITP nachgewiesen werden können. So beschreibt die Literatur, dass Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIIa durch verschiedene Antikörpertests (Antigen-Capture Assay bzw. Kombination mehrerer Tests) in 32-39% nachweisbar sind (Nomura et al. 1991, McMillan et al. 1987), in dieser Studie können mittels direktem MAIPA Antikörper gegen GP IIb/IIIa in 27,8% nachgewiesen werden. Ein positiver Antikörpernachweis gegen Glykoprotein Ib/IX erfolgt laut Literatur in 19-22% der Fälle (Nomura et al. 1991, McMillan et al. 1987), in dieser Studie liegt der Nachweis mit 23,4% diskret höher. Diese Ergebnisse sind aber nur eingeschränkt miteinander vergleichbar, da zur Erlangung dieser Werte unterschiedliche Antikörpertests eingesetzt wurden. Besser vergleichen lassen sich Ergebnisse, die ausschließlich mittels des direkten MAIPAs erzielt wurden. Hierzu beschreiben Brighton et al. (n=40) einen positiven Antikörpernachweis gegen GP IIb/IIIa bei 88% der Patienten mit positivem direkten MAIPA, ein isolierter Nachweis gegen GP IIb/IIIa liegt bei 48% dieser Patienten vor. In dieser Studie (n=40) fallen die Werte für GP IIb/IIIa etwas geringer aus: 77,5% der Patienten mit positivem direkten MAIPA weisen Antikörper gegen GP IIb/IIIa auf, ein isolierter Nachweis gegen GP IIb/IIIa ist bei 25,0% der Patienten zu verzeichnen. Antikörper gegen GP Ib/IX weisen in der Studie von Brighton et al. 53,0% der Patienten mit positivem direkten MAIPA auf (13,0% isoliert), in dieser Studie ist ein positiver Antikörpernachweis gegen GP Ib/IX mit 75,0% und ein isolierter Antikörpernachweis gegen GP Ib/IX mit 22,5% deutlich höher.

Die Durchführung eines indirekten Antikörpernachweises gegen Glykoproteine hat sich laut der Literatur als nicht sinnvoll erwiesen, da positive Ergebnisse nur selten zu verzeichnen sind. In dieser Studie ist der indirekte Antikörpernachweis mit 50% positiven Ergebnissen relativ hoch. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass der indirekte Antikörpernachweis vor allem bei jenen Patienten durchgeführt wurde, die bereits positive Ergebnisse im direkten MAIPA aufgezeigt hatten (53,8% der Patienten), so dass von einem verzerrten Patientenkollektiv auszugehen ist.

Übereinstimmend mit der Literatur hingegen ist die Verteilung im indirekten Antikörpernachweis: Der Nachweis gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX bzw. beide Glykoproteine ist in dieser Studie in etwa zu gleichen Teilen positiv (34,6%, 34,6%, 30,8%), eine ähnliche Verteilung zeigen auch die Ergebnisse von Brighton et al. (30%, 30%, 39%).

### **4.3 Antikörpernachweis gegen Glykoprotein V**

Ein Ziel der vorliegenden Studie soll die Überprüfung sein, ob Glykoprotein V ebenfalls ein wichtiges Zielantigen im Rahmen der Antikörperproduktion bei ITP-Patienten darstellt. In bisherigen Untersuchungen wurden bei Patienten mit positivem Ergebnis im PIFT Antikörper gegen Glykoprotein V in 10-22% gefunden (Joutsu et al. 1997, Joutsu-Korhonen et al. 2001). Hierbei handelte es sich aber nicht ausschließlich um ITP-Patienten, sondern um Patienten mit einer Thrombozytopenie unterschiedlicher Ursache. In dieser Studie konnte bei 113 ITP-Patienten ein Antikörpernachweis gegen Glykoprotein V mittels des direkten MAIPA durchgeführt werden. Eine Präselektion durch einen positiven PIFT fand dabei nicht statt, da sich der Nachweis von den Gesamt-Immunglobulinen für die Diagnose einer ITP, wie bereits beschrieben, als nicht sinnvoll erwiesen hat. Positive Resultate für GP V im direkten MAIPA zeigen sich bei 19,5% der Patienten (22 von 113 Patienten). Zum Vergleich lassen sich bei 27,8% (42 von 151 Patienten) Antikörper gegen GP IIb/IIIa nachweisen und ein positiver Antikörpernachweis gegen GP Ib/IX ist bei 23,4% (30 von 128 Patienten) zu verzeichnen. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Glykoprotein V mit einem Antikörpernachweis bei 19,5% der ITP-Patienten ein wichtiges Zielantigen bei der ITP ist. Jedoch muss auch festgehalten werden, dass Glykoprotein IIb/IIIa mit einem Antikörpernachweis bei 27,8% der ITP-Patienten, wie auch in bisherigen Studien beschrieben, das wichtigste Zielantigen bei der ITP darstellt. Und auch Glykoprotein Ib/IX ist mit einem Antikörpernachweis bei 23,4% der ITP-Patienten eine größere Relevanz zuzuordnen als Glykoprotein V.

Um die Verteilung der Antikörper bei den ITP-Patienten besser aufzuzeigen, werden jene 34 ITP-Patienten genauer betrachtet, bei denen die drei Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und V getestet wurden und sich mindestens ein Antikörper im direkten MAIPA nachweisen ließ. 70,6% der ITP-Patienten mit positivem direkten MAIPA weisen Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIIa auf (24 von 34 Patienten), bei 73,6% ist ein

positiver Antikörnernachweis gegen GP Ib/IX zu verzeichnen (25 von 34 Patienten) und 64,7% zeigen Antikörper gegen Glykoprotein V (22 von 34 Patienten). Diese Ergebnisse zeigen nur geringe Differenzen in der Häufigkeit des Antikörnernachweises gegen die Glykoproteine IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V. In über der Hälfte der Fälle (67,6%, 23 von 34 Patienten) ist der Antikörnernachweis gegen mehrere Glykoproteine gleichzeitig positiv, 41,2% (14 von 34 Patienten) weisen sogar Antikörper gegen alle drei Glykoproteine auf. 20,6% der Patienten zeigen isoliert Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIIa (7 von 34 Patienten). Ein isolierter Antikörnernachweis gegen GP Ib/IX gelingt bei drei Patienten (8,8%), ein Patient (2,9%) weist isoliert Antikörper gegen GP V auf. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich festhalten, dass im Falle eines positiven Antikörnernachweises zumeist Antikörper gegen mehr als ein Glykoprotein nachzuweisen sind. Zu dieser Feststellung kamen auch He et al. (1994).

#### **4.4 Einfluss der Glykoprotein-Antikörper auf Thrombozyten und MPV**

Wie bereits beschrieben weisen ITP-Patienten im Blutbild eine isolierte Thrombozytopenie auf, zudem ist das MPV (durchschnittlichen Thrombozytenvolumen) oft erhöht. Es stellt sich die Frage, ob sich ITP-Patienten mit positivem Antikörnernachweis gegen eines der Glykoproteine von jenen Patienten unterscheiden, die unter einer ITP leiden, aber keine Antikörper gegen Glykoproteine aufweisen.

Bei ITP-Patienten mit positivem Antikörnernachweis liegt der Median der Thrombozytenzahl bei 30.000/ $\mu$ l, ITP-Patienten ohne Antikörnernachweis weisen einen Median von 42.000/ $\mu$ l auf. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests kann berechnet werden, dass hier eine signifikante Differenz vorliegt, d.h. ITP-Patienten mit positivem Antikörnernachweis weisen durchschnittlich eine niedrigere Thrombozytenzahl auf als ITP-Patienten ohne Antikörnernachweis.

ITP-Patienten mit positivem Antikörnernachweis weisen in Bezug auf das MPV einen Median von 13,1 fl auf, bei ITP-Patienten ohne Antikörnernachweis liegt der Median bei 11,7 fl. Ein erhöhtes MPV ( $\geq 12$  fl) zeigen 80% der ITP-Patienten mit positivem Antikörnernachweis, bei den ITP-Patienten ohne Antikörnernachweis ist das MPV bei 41,5% erhöht. Auch hier zeigt sich mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests eine

signifikante Differenz, d.h. ITP-Patienten mit positivem Antikörnernachweis weisen durchschnittlich ein höheres MPV auf als ITP-Patienten ohne Antikörnernachweis.

#### **4.5 Sekundäre ITP**

Die Form der ITP ist bei den Patienten in dieser Studie bei 84,2% idiopathisch, 15,8% weisen hingegen eine sekundäre ITP auf. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur, wo sekundäre ITP-Formen bei bis zu 20% der ITP-Patienten beschrieben werden. Zu den häufigsten zugrunde liegenden Erkrankungen zählt die Literatur den systemischen Lupus erythematoses, das Antiphospholipidsyndrom, Leukämien, Immundefektsyndrome, Infektionen und das Evans-Syndrom (Cines et al. 2009). Diese Krankheitsbilder sind auch in dieser Studie als zugrunde liegende Erkrankungen sekundärer ITP-Formen zu beobachten. Hinzu kommen in dieser Studie noch weitere Kollagenosen, zwei Fälle einer rheumatoiden Arthritis und ein Patient mit Zustand nach Stammzelltransplantation.

Bezüglich des Alters und des Geschlechts sind zwischen Patienten mit (idiopathischer) ITP und sekundärer ITP keine großen Differenzen festzustellen. Der Altersmedian bei den Erwachsenen beträgt jeweils 53 Jahre. Bei den Kindern liegt der Altersmedian der ITP-Patienten bei fünf Jahren, der Altersmedian der sekundären ITP-Patienten ist mit 5,5 Jahren geringfügig höher. Während bei den (idiopathischen) ITP-Patienten ein leichter Übergang an weiblichen Patienten (52,1% Frauen, 47,9% Männer) zu verzeichnen ist, sind bei den sekundären ITP-Patienten mehr Männer betroffen (40,0% Frauen, 60,0% Männer). Hierbei könnte jedoch die geringe Fallzahl der sekundären ITP-Patienten (n = 44) zu einer Verzerrung geführt haben.

Ein positiver Antikörnernachweis im direkten MAIPA ist bei 68,2% der Patienten mit sekundärer ITP zu dokumentieren. Zum Vergleich gelang bei Patienten mit (idiopathischer) ITP bei nur 34,3% der Patienten ein positiver Antikörnernachweis. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes kann gezeigt werden, dass zwischen Patienten mit (idiopathischer) ITP und Patienten mit sekundärer ITP eine signifikante Differenz bezüglich des Antikörnernachweises vorliegt; Patienten mit sekundärer ITP weisen signifikant häufiger Antikörper im direkten MAIPA auf als Patienten mit (idiopathischer) ITP.

Wie auch bei den Patienten mit (idiopathischer) ITP zeigt sich bei den Patienten mit sekundärer ITP Glykoprotein IIb/IIIa als wichtiges Zielantigen. Antikörper gegen GP

IIb/IIIa können bei 39,5% der Patienten mit sekundärer ITP nachgewiesen werden; bei zwei Patienten ist ein isolierter Antikörperrnachweis gegen GP IIb/IIIa zu dokumentieren. Ein positiver Antikörperrnachweis gegen GP Ib/IX liegt bei 41,7% der Patienten vor, vier Patienten weisen isoliert Antikörper gegen GP Ib/IX auf. 33,3% der Patienten zeigen Antikörper gegen GP V, bei zwei Patienten ist ein isolierter Antikörperrnachweis gegen GP V zu dokumentieren.

#### **4.6 Sensitivität und Spezifität**

In dieser Studie soll überprüft werden, ob der Antikörperrnachweis gegen Glykoprotein V die bekanntlich niedrige Sensitivität des Glykoprotein-spezifischen Antikörperrnachweises verbessert.

Für die Berechnung der Sensitivität und der Spezifität wurden die Patienten mit einer ITP und sekundärer ITP im Rahmen einer anderen Grunderkrankung zusammengefasst. Es wurden nur jene Patienten mit in die Wertung genommen, bei denen der direkte Antikörperrnachweis gegen mindestens ein Glykoprotein durchgeführt wurde.

Berechnet man die Sensitivität in dieser Studie nur anhand des positiven Antikörperrnachweises gegen Glykoprotein IIb/IIIa, so liegt diese bei 34,0%. Wird zusätzlich der Anteil an Patienten mit positivem Antikörperrnachweis gegen Glykoprotein Ib/IX hinzugezogen, steigt die Sensitivität um 4,1% auf 38,1%. Die Sensitivität in dieser Studie unter Berücksichtigung der Glykoproteine IIb/IIIa und Ib/IX liegt mit 38,1% am unteren Rand der bisherigen Veröffentlichungen, die eine Sensitivität von 39-49% beschreiben (Kiefel et al. 1996, Brighton et al. 1996, Warner et al. 1999, Hagenström et al. 2000).

Bezieht man nun die Patienten mit positivem Antikörperrnachweis gegen Glykoprotein V mit in die Berechnung ein, so steigt die Sensitivität nochmals um 1,6% auf insgesamt 39,7%. Obgleich eine Steigerung der Sensitivität mit 1,6% relativ gering erscheint, so muss dennoch festgehalten werden, dass ohne den GP V-Antikörperrnachweis drei ITP-Patienten dem Nachweis von Antikörpern entgangen wären. Zudem muss berücksichtigt werden, dass bei 26,2% (51 der 194 ITP-Patienten) kein Antikörperrnachweis gegen GP V durchgeführt werden konnte aufgrund einer zu kleinen Blutprobe. Hätte der Antikörperrnachweis gegen GP V bei allen ITP-Patienten durchgeführt werden können, wäre noch eine Steigerung der Sensitivität durch Einbeziehung von GP V zu erwarten gewesen.

Die in bisherigen Studien mit 78-100% (Kiefel et al. 1996, Brighton et al. 1996, Warner et al. 1999, Hagenström et al. 2000) als hoch beschriebene Spezifität konnte in dieser Studie mit einer Spezifität von 99,4% bestätigt werden. Lediglich zwei Patienten ohne Diagnose einer ITP wiesen Antikörper gegen Glykoproteine auf: Ein Patient litt unter einer hämophagozytären Lymphohistiozytose, bei einem Patienten lag ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS) zu Grunde, wobei erwähnt werden muss, dass es Übergangsformen zwischen einer ITP und einem MDS gibt.

#### **4.7 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein V ein wichtiges Zielantigen bei Patienten mit einer ITP ist, obgleich den Glykoproteinen Ib/IX und vor allem Glykoprotein IIb/IIIa eine größere Relevanz zugesprochen werden muss. Dennoch beträgt die Sensitivität auch unter Kombination der drei Antikörpertests gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/I und GP V nur 39,7%, d.h. bei der Mehrzahl der ITP-Patienten konnten keine Glykoprotein-Antikörper nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, wie die Sensitivität verbessert werden könnte.

Es ist nicht auszuschließen, dass es noch weitere bislang nicht identifizierte Zielantigene neben den Glykoproteinen IIb/IIIa, Ib/IX und V im Rahmen der ITP gibt, die möglicherweise die Sensitivität verbessern könnten. Doch erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die Sensitivität durch Detektion eines weiteren Zielantigens deutlich steigen würde. So war die Sensitivität durch Hinzunahme des Antikörperrnachweises gegen GP Ib/IX zusätzlich zum Antikörperrnachweis gegen GP IIb/IIIa nur geringfügig von 34,0% auf 38,1% gestiegen. Noch geringer war die Zunahme der Sensitivität unter zusätzlicher Berücksichtigung des Antikörperrnachweises gegen GP V, hier stieg die Sensitivität nur um weitere 1,6% von 38,1% auf 39,7%. Es hat sich gezeigt, dass GP V zwar ein wichtiges Zielantigen bei der ITP ist mit einem Antikörperrnachweis bei 19,5% der ITP-Patienten und bei 33,3% der Patienten mit sekundärer ITP, jedoch lagen bei der Mehrzahl dieser Patienten bereits Antikörper gegen GP IIb/IIIa und/oder GP Ib/IX vor. Ein isolierter Antikörperrnachweis gegen GP V zeigte sich bei nur drei Patienten (ein ITP-Patient, zwei Patienten mit sekundärer ITP), so dass die Sensitivität nicht signifikant gebessert werden konnte.

Zur Verbesserung der Sensitivität erscheint es zielführender, einen geeigneten Test zu finden, der die Glykoprotein-Antikörper sicher nachweist. Najaoui et al. (2012) zeigten,

dass bei vielen ITP-Patienten die Komplementbindungsreaktion durch Antikörper aktiviert werden konnte. Auch bei 30% der ITP-Patienten ohne nachweisbare Antikörper gegen eines der Glykoproteine wurden komplementaktivierende Eigenschaften nachgewiesen (Najaoui et al. 2012). Das legt die Vermutung nahe, dass bisherige Antikörpertests wie der MAIPA unzureichend in der Nachweisbarkeit der Antikörper sind. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass es beim MAIPA durch mehrere Waschschrte zu einer Dissoziation des Antikörpers kommen kann (Bakchoul et al. 2007). Weitere mögliche Ursachen für eine unzureichende Nachweisbarkeit des MAIPAs könnten fluktuierende Antikörper-Spiegel bei den ITP-Patienten sein, zudem könnte die bei ITP-Patienten verminderte Thrombozytenzahl dazu führen, dass es nicht immer möglich ist, alle Glykoproteine auf eine Beladung mit Autoantikörpern zu untersuchen.



## 5 Zusammenfassung

Bei der ITP (Immunthrombozytopenie) handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der Antikörper gegen Thrombozyten gebildet werden. Die bislang wichtigsten identifizierten Zielantigene sind die thrombozytären Glykoproteine IIb/IIIa und Ib/IX. Dennoch können bei 40% der ITP-Patienten keine Antikörper gefunden werden, die Sensitivität ist dementsprechend gering. Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob das thrombozytäre Glykoprotein V ein weiteres wichtiges Zielantigen im Rahmen der ITP ist und ob die Sensitivität von Glykoprotein-spezifischen Tests durch den Nachweis von Glykoprotein V-Antikörpern verbessert werden kann.

Es erfolgte eine Datenauswertung von 1511 Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer ITP, deren Blutproben auf den Nachweis von Antikörpern gegen die Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und V mittels des direkten MAIPAs, einem Glykoprotein-spezifischem Antikörpertest, untersucht wurden. Nach Ausschluss jener Patienten, bei denen eine ITP unwahrscheinlich erschien, konnten 163 ITP-Patienten gezählt werden. Bei 34,3% der Patienten konnte mindestens ein Glykoprotein-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Ein Antikörper-nachweis gegen GP IIb/IIIa war bei 27,8% der Patienten zu beobachten, 23,4% der Patienten wiesen Antikörper gegen GP Ib/IX auf und bei 19,5% der Patienten gelang ein Antikörperrnachweis gegen GP V. Anhand dieser Ergebnisse kann festgehalten werden, dass Glykoprotein V ein wichtiges Zielantigen bei der ITP ist, obgleich den Glykoproteinen Ib/IX und vor allem IIb/IIIa eine größere Relevanz zugesprochen werden muss. Die bekanntlich niedrige Sensitivität des Glykoprotein-spezifischen Antikörperrnachweises bestätigte sich in dieser Studie mit einer Sensitivität von 38,1% unter Berücksichtigung der Antikörper gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX. Unter Hinzunahme von Antikörpern gegen GP V stieg die Sensitivität nur geringfügig um 1,6% auf 39,7%. Bei einem Großteil der ITP-Patienten mit positivem Antikörperrnachweis gegen GP V lagen bereits Antikörper gegen GP IIb/IIIa und/oder GP Ib/IX vor, ein isolierter Antikörperrnachweis gegen GP V gelang bei nur drei Patienten (ein ITP-Patient, zwei Patienten mit sekundärer ITP). Somit konnte die Sensitivität durch den zusätzlichen Antikörperrnachweis gegen GP V nicht signifikant verbessert werden. Dennoch kann festgehalten werden, dass eine Immunisierung gegen GP V einen relevanten Mechanismus bei der ITP darstellt.

## 6 Summary

ITP (immunthrombocytopenia) is an immune mediated disease causing antibodies against platelets. So far, the main target antigens are the glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX. However, in 40% of patients with ITP glycoprotein specific antibodies are not detectable. According to this the sensitivity is low. The present study was designed to explore the relevance of glycoprotein V as another target antigen in ITP. Another aim of the study was to analyze if the detection of antibodies against glycoprotein V can improve the sensitivity of laboratory testing against glycoprotein specific antibodies. Blood samples of 1511 patients with suspected ITP were tested for antibodies against the glycoproteins IIb/IIIa, Ib/IX and V. In 163 patients the clinical picture strongly suggested ITP. Antibodies against at least one glycoprotein were noted in 34,3%. Platelet antibodies against GP IIb/IIIa, GP Ib/IX and V were detected in 27,8%, 23,4% and 19,5%. These results indicate that glycoprotein V is an important target antigen in ITP, however glycoproteins Ib/IX and especially IIb/IIIa are of major relevance. The low sensitivity of glycoprotein specific antibody detection was proved in this study by achieving a sensitivity of 38,1% for antibody detection against GP IIb/IIIa and GP Ib/IX. Taking antibodies against glycoprotein V into account the sensitivity increased marginally by 1,6%. Most of the ITP patients with autoantibodies against GP V also have autoantibodies against GP IIb/IIIa and Ib/IX, isolated autoantibodies against GP V were only found in three ITP patients (one patient with immunthrombocytopenia, two patients with secondary ITP). These findings show that the sensitivity could not be improved significantly by additional antibody detection against glycoprotein V. However, it can be noted that immunization against GP V constitutes an important mechanism in ITP.

# Literaturverzeichnis

**Andrews RK**, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, López JA, Berndt MC: The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling.

Thromb Haemost. **1999**; 82:357-64

**Bakchoul T**, Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Bein G, Sachs UJ, Salaam A, Santoso S: Rapid detection of HPA-1 alloantibodies by platelet antigens immobilized on microbeads.

Transfusion. **2007**; 47(8):1363-8

**Berchtold P**, Müller D, Beardsley D, Fujisawa K, Kaplan C, Kekomäki R, Lipp E, Morell-Kopp MC, Kiefel V, McMillan R, von dem Borne AE, Imbach P: International study to compare antigen-specific methods used for the measurement of antiplatelet autoantibodies.

Br J Haematol. **1997**; 96:477-83

**Bienz D**, Schnippering W, Clemetson KJ: Glycoprotein V is not the thrombin activation receptor on human blood platelets.

Blood. **1986**; 68:720-5

**Bierling P**, Bettaieb A, Fromont P, Favrin M, Duedari N: Anti-GMP140 (CD62) autoantibody in a patient with autoimmune thrombocytopenic purpura.

Br J Haematol. **1994**; 87:631-3

**Boylan B**, Chen H, Rathore V, Paddock C, Salacz M, Friedman KD, Curtis BR, Stapleton M, Newman DK, Kahn ML, Newman PJ: Anti-GP VI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GP VI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface.

Blood **2004**; 104:1350-5

**Bray PF**, Rosa JP, Johnston GI, Shiu DT, Cook RG, Lau C, Kan YW, McEver RP, Shuman MA: Platelet glycoprotein IIb. Chromosomal localization and tissue expression.

J Clin Invest. **1987**; 80:1812-7

**Brighton TA**, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH: Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias.

Blood. **1996**; 88:194-201

**Burdach SE**, Evers KG, Geursen RG: Treatment of acute idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood with intravenous immunoglobulin G: comparative efficacy of 7S and 5S preparations.

J Pediatr. **1986**; 109:770-5

**Bussel JB, Pham LC**: Intravenous treatment with gammaglobulin in adults with immune thrombocytopenic purpura: review of the literature.

Vox Sang. **1987**; 52:206-11

**Butros LJ**, Bussel JB: Intracranial hemorrhage in immune thrombocytopenic purpura: a retrospective analysis.

J Pediatr Hematol Oncol. **2003**; 25:660-4

**Carnahan GE, Cunningham LW**: Comparative analysis of glycopeptides derived from human platelet membrane glycoprotein Ib.

Biochemistry. **1983**; 22:5384-9

**Carrell NA**, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR: Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy.

J Biol Chem. **1985**; 260:1743-9

**Chang M**, Nakagawa PA, Williams SA, Schwartz MR, Imfeld KL, Buzby JS, Nugent DJ: Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro.

Blood **2003**; 102:887-95

**Cines DB, Blanchette VS**: Immune thrombocytopenic purpura.

N Engl J Med. **2002**; 346:995-1008

**Cines DB**, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET: The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity.

Blood. **2009**; 113:6511-21

**Clemetson KJ**, Naim HY, Lüscher EF: Relationship between glycosialin and glycoprotein Ib of human platelets.

Proc Natl Acad Sci USA. **1981**; 78:2712-6

**Cortelazzo S**, Finazzi G, Buelli M, Molteni A, Viero P, Barbui T: High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.

Blood. **1991**; 77:31-3

**De Marco L**, Mazzucato M, Masotti A, Ruggeri ZM: Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha.

J Biol Chem. **1994**; 269:6478-84

**Diaz-Ricart M**, Fuste B, Estebanell E, Tonda R, Lozano M, Escolar G, Jamieson G, Ordinas A: Efficient tyrosine phosphorylation of proteins after activation of platelets with thrombin depends on intact glycoprotein Ib.  
Platelets. 2005; 16:453-61

**D'Souza SE**, Ginsberg MH, Burke TA, Lam SC, Plow EF: Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor.  
Science. 1988; 242:91-3

**Du X**, Beutler L, Ruan C, Castaldi PA, Berndt MC: Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane.  
Blood. 1987; 69:1524-7

**Filion MC**, Proulx C, Bradley AJ, Devine DV, Sékaly RP, Décary F, Chartrand P.: Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells.  
Blood. 1996; 88:2144-50

**Frederiksen H**, Schmidt K: The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age.  
Blood 1999; 94:909-13

**Fujisawa K**, Tani P, Piro L, McMillan R: The effect of therapy on platelet-associated autoantibody in chronic immune thrombocytopenic purpura.  
Blood. 1993; 81:2872-7

**Garner SF**, Campbell K, Metcalfe P, Keidan J, Huiskes E, Dong JF, López JA, Ouwehand WH: Glycoprotein V: the predominant target antigen in gold-induced autoimmune thrombocytopenia.  
Blood. 2002; 100:344-6

**George JN**, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, Blnachette VS, Bussel JB, Cines DB, Kelton JG, Lichtin AE, McMillan R, Okerbloom JA, Regan DH,Warrier I: Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology.  
Blood. 1996; 88:3-40

**Hagenström H**, Schlenke P, Hennig H, Kirchner H, Klüter H: Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia.  
Thromb Haemost. 2000; 84:779-83

**Handa M**, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Ruggeri ZM: The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. Characterization by monoclonal antibodies and partial amino acid sequence analysis of proteolytic fragments.  
J Biol Chem. **1986**; 261:12579-85

**Handin RI**, Stossel TP: Effect of corticosteroid therapy on the phagocytosis of antibody-coated platelets by human leukocytes.  
Blood. **1978**; 51:771-9

**He R**, Reid DM, Jones CE, Shulman NR: Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.  
Blood. **1994**; 83:1024-32

**Heidenreich R**, Eisman R, Surrey S, Delgrosso K, Bennett JS, Schwartz E, Poncz M: Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb.  
Biochemistry. **1990**; 29:1232-44

**Hickey MJ**, Deaven LL, Roth GJ: Human platelet glycoprotein IX. Characterization of cDNA and localization of the gene to chromosome 3.  
FEBS Lett. **1990**; 274:189-92

**Hickey MJ**, Hagen FS, Yagi M, Roth GJ: Human platelet glycoprotein V: characterization of the polypeptide and the related Ib-V-IX receptor system of adhesive, leucine-rich glycoproteins.  
Proc Natl Acad Sci USA. **1993**; 90:8327-31

**Hickey MJ, Roth GJ**: Characterization of the gene encoding human platelet glycoprotein IX.  
J Biol Chem. **1993**; 268:3438-43

**Hynes RO**: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.  
Cell. **1992**; 69:11-25

**Isenberg WM**, McEver RP, Phillips DR, Shuman MA, Bainton DF: The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering.  
J Cell Biol. **1987**; 104:1655-63

**Jandrot-Perrus M**, Guillin MC, Nurden AT: Human gamma-thrombin: lack of correlation between a platelet functional response and glycoprotein V hydrolysis.  
Thromb Haemost. **1987**; 58:915-20

**Jennings LK, Phillips DR:** Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex.

J Biol Chem. **1982**; 257:10458-66

**Joutsu L, Kekomäki R:** Comparison of the direct platelet immunofluorescence test (direct PIFT) with a modified direct monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (direct MAIPA) in detection of platelet-associated IgG.

Br J Haematol 1997; 96:204-9

**Joutsu L, Javela K, Hormila P, Kekomäki R:** Glycoprotein V-specific platelet-associated antibodies in thrombocytopenic patients.

Clin Lab Haematol. **2001**; 23:307-12

**Kelly MD, Essex DW, Shapiro SS, Meloni FJ, Druck T, Huebner K, Konkle BA:** Complementary DNA cloning of the alternatively expressed endothelial cell glycoprotein Ib beta (GPIb beta) and localization of the GPIb beta gene to chromosome 22.

J Clin Invest. **1994**; 93:2417-24

**Kiefel V, Freitag E, Kroll H, Santoso S, Mueller-Eckhardt C:** Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia.

Ann Hematol. **1996**; 72:280-5

**Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Müller-Eckhardt C:** Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies.

Blood **1987**; 70:1722-6

**Kitchens CS, Pendergast JF:** Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticosteroid administration.

Blood. **1986**; 67:203-6

**Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J:** Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain.

Biochemistry. **1984**; 23:1767-74

**Kobe B, Kajava AV:** The leucine-rich repeat as a protein recognition motif.

Curr Opin Struct Biol. **2001**; 11:725-32

**Kuter DJ**, Bussel JB, Lyons RM, Pullarkat V, Gernsheimer TB, Senecal FM, Aledort LM, George JN, Kessler CM, Sanz MA, Liebman HA, Slovic FT, de Wolf JT, Bourgeois E, Guthrie TH Jr, Newland A, Wasser JS, Hamburg SI, Grande C, Lefrère F, Lichtin AE, Tarantino MD, Terebello HR, Viallard JF, Cuevas FJ, Go RS, Henry DH, Redner RL, Rice L, Schipperus MR, Guo DM, Nichol JL: Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial.

Lancet. **2008**; 371(9610):395-403

**Kuwana M**, Kaburaki J, Kitasato H, Kato M, Kawai S, Kawakami Y, Ikeda Y: Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura.

Blood. **2001**; 98:130-9

**Kuwana M**, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y: Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura.

J Immunol. 2002; 168:3675-82

**Lanza F**, Morales M, de La Salle C, Cazenave JP, Clemetson KJ, Shimomura T, Phillips DR.: Cloning and characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. A member of the leucine-rich glycoprotein family cleaved during thrombin-induced platelet activation.

J Biol Chem. **1993**; 268:20801-7

**Li CQ**, Dong JF, Lanza F, Sanan DA, Sae-Tung G, López JA: Expression of platelet glycoprotein (GP) V in heterologous cells and evidence for its association with GP Ib alpha in forming a GP Ib-IX-V complex on the cell surface.

J Biol Chem. **1995**; 270:16302-7

**Matzdorff A**, Giagoudinis A, Greinacher A, Hiller E, Kiefel V, Müller-Beisenhirtz H, Ostermann H, Rummel M, Sachs U., Salama A: Diagnostik und Therapie der Immunthrombozytopenie.

Onkologie **2010**, 33:2-20

**Mayer JL**, Beardsley DS: Varicella-associated thrombocytopenia: autoantibodies against platelet surface glycoprotein V.

Pediatr Res. **1996**; 40:615-9

**McMillan R**, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods VL Jr: Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP.

Blood **1987**; 70:1040-5



**McMillan R:** Therapy for adults with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura.

Ann Intern Med. **1997**; 126:307-14

**Meyer SC, Fox JE:** Interaction of platelet glycoprotein V with glycoprotein Ib-IX regulates expression of the glycoproteins and binding of von Willebrand factor to glycoprotein Ib-IX in transfected cells.

J Biol Chem. **1995**; 270:14693-9

**Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE:** Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane.

J Biol Chem. **1992**; 267:364-9

**Mulder A, van Leeuwen EF, Veenboer GJ, Tetteroo PA, von dem Borne AE:** Immunochemical characterization of platelet-specific alloantigens.

Scand J Haematol. **1984**; 33:267-74

**Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, Sachs UJ:** Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP).

Eur J Haematol. **2012**; 88:167-74

**Neylon AJ, Saunders PW, Howard MR, Proctor SJ, Taylor PR:** Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients.

Br J Haematol. **2003**; 122:966-74

**Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C, Kerowgan M, Klüter H:** A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA.

Br J Haematol. **2004**; 127:552-60

**Nguyen XD, Goebel M, Schober M, Klüter H, Panzer S:** The detection of platelet antibodies by simultaneous analysis of specific platelet antibodies and the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens: an interlaboratory comparison.

Transfusion. **2010**

**Nomura S, Yanabu M, Soga T, Kido H, Fukuroi T, Yamaguchi K, Nagata H, Kokawa T, Yasunaga K:** Analysis of idiopathic thrombocytopenic purpura patients with antiglycoprotein IIb/IIIa or Ib autoantibodies.

Acta Haematol. **1991**; 86:25-30

**Nugent DJ:** Childhood immune thrombocytopenic purpura.

Blood Rev. **2002**; 16:27-9

**O'Toole TE**, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH: Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol.* **1994**; 124:1047-59

**Phillips DR, Agin PP**: Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem.* **1977**; 252:2121-6

**Portielje JE**, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A: Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* **2001**; 97:2549-54

**Provan D**, Stasi R, Newland A, Blanchette V, Bolton-Maggs P, Bussel J, Chong B, Cines D, Gernsheimer T, Godeau B, Grainger J, Greer I, Hunt B, Imbach P, Lyons G, McMillan R, Rodeghiero F, Sanz M, Tarantino M, Watson S, Young J, Kuter D: International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood.* **2010**; 115-2

**Pytela R**, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E: Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors. *Science.* **1986**; 231:1559-62

**Ramakrishnan V**, Reeves PS, DeGuzman F, Deshpande U, Ministri-Madrid K, DuBridge RB, Phillips DR: Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**; 96:13336-41

**Rand ML**, Wright JF: Virus-associated idiopathic thrombocytopenic purpura. *Transfus Sci.* **1998**; 19:253-9

**Roth GJ**, Church TA, McMullen BA, Williams SA: Human platelet glycoprotein V: a surface leucine-rich glycoprotein related to adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* **1990**; 170:153-61

**Savage B**, Shattil SJ, Ruggeri ZM: Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* **1992**; 267:11300-6

**Schilling RF**: Estimating the risk for sepsis after splenectomy in hereditary spherocytosis. *Ann Intern Med.* **1995**; 122:187-8

**Schneider W, Schnaidt M:** The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test.  
Blut **1981**; 43:389-92

**Semple JW,** Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V, Freedman J.: Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity.  
Blood. **1996**; 87:4245-54

**Solanilla A,** Pasquet JM, Viallard JF, Contin C, Grosset C, Déchanet-Merville J, Dupouy M, Landry M, Belloc F, Nurden P, Blanco P, Moreau JF, Pellegrin JL, Nurden AT, Ripoche J: Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura.  
Blood **2005**; 105:215-8

**Stasi R,** Del Poeta G, Stipa E, Evangelista ML, Trawinska MM, Cooper N, Amadori S.: Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.  
Blood. **2007**; 110:2924-30

**Stasi R,** Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, Amadori S: Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management.  
Thromb Haemost. **2008**; 99:4-13

**Stricker RB, Shuman MA:** Quinidine purpura: evidence that glycoprotein V is a target platelet antigen.  
Blood. **1986**; 67:1377-81

**Tazzari PL,** Ricci F, Vianelli N, Tassi C, Belletti D, Pierri I, Gugliotta L, Gobbi M, Conte R: Detection of platelet-associated antibodies by flow cytometry in hematological autoimmune disorders.  
Ann Hematol. **1995**; 70:267-72

**Terrell DR,** Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN: The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports.  
Am Journal Hematol. **2010**; 85:174-80

**van der Schoot CE,** Wester M, Von Dem Borne AE, Huisman HG: Characterization of platelet-specific alloantigens by immunoblotting: localization of Zw and Bak antigens.  
Br J Haematol. **1986**; 64:715-23

**van Leeuwen EF**, van der Ven JT, Engelfriet CP, von dem Borne AE: Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia.  
Blood **1982**; 59:23-6

**Vicente V**, Houghten RA, Ruggeri ZM: Identification of a site in the alpha chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding.  
J Biol Chem. **1990**; 265:274-80

**von dem Borne AE**, Verheugt FW, Oosterhof F, von Riesz E, de la Rivière, Engelfriet CP: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies.  
Br J Haematol. 1978; 39:195-207

**Wagner CL**, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE: Analysis of GP IIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets.  
Blood. **1996**; 88:907-14

**Warner MN**, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG: A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura.  
Br J Haematol. **1999**; 104:442-7

**Wencel-Drake JD**, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH: Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses.  
Am J Pathol. **1986**; 124:324-34

**Wenger RH**, Kieffer N, Wicki AN, Clemetson KJ: Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene.  
Biochem Biophys Res Commun. 1988; 156:389-95

**Wenger RH**, Wicki AN, Kieffer N, Adolph S, Hameister H, Clemetson KJ: The 5' flanking region and chromosomal localization of the gene encoding human platelet membrane glycoprotein Ib alpha.  
Gene. **1989**; 85:517-24

**Wicki AN, Clemetson KJ**: Structure and function of platelet membrane glycoproteins Ib and V. Effects of leukocyte elastase and other proteases on platelets response to von Willebrand factor and thrombin.  
Eur J Biochem. **1985**; 153:1-11

**Wicki AN, Clemetson KJ**: The glycoprotein Ib complex of human blood platelets.  
Eur J Biochem. **1987**; 163:43-50

**Woods VL Jr**, Wolff LE, Keller DM: Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins.

J Biol Chem. **1986** Nov 15;261(32):15242-51

**Yagi M**, Edelhoff S, Disteche CM, Roth GJ: Structural characterization and chromosomal location of the gene encoding human platelet glycoprotein Ib beta.

J Biol Chem. **1994**; 269:17424-7

**Yagi M**, Edelhoff S, Disteche CM, Roth GJ: Human platelet glycoproteins V and IX: mapping of two leucine-rich glycoprotein genes to chromosome 3 and analysis of structures.

Biochemistry. **1995**; 34:16132-7

**Yanabu M**, Nomura S, Fukuroi T, Suzuki M, Kawakatsu T, Kido H, Yamaguchi K, Kokawa T, Yasunaga K: Platelet activation induced by an antiplatelet autoantibody against CD9 antigen and its inhibition by another autoantibody in immune thrombocytopenic purpura.

Br J Haematol. **1993**; 84:694-701

**Zimrin AB**, Gidwitz S, Lord S, Schwartz E, Bennett JS, White GC 2nd, Poncz M: The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa.

J Biol Chem. **1990**; 265:8590-5

# Anhang

## Erfassungsbogen zur ITP

<b>Erfassungsbogen zur Autoimmunthrombozytopenie (ITP)</b>					
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen, Fax: 0641-99-41529					
Patientenname, -vorname					
Geburtsdatum					
Laufende Nummer					
Thrombozytenzahl bei Einsendung (in Tsd/ $\mu$ l)					
Unser thrombozytenimmunologischer Befund					
<b>1. Verdachtsdiagnose und Begleiterkrankungen</b>					
Klinische Verdachtsdiagnose:					
Seit wann besteht die Erkrankung?					
Bluttransfusionen (Zeitpunkt, Anzahl)?		Schwangerschaften (Anzahl)?			
Bitte markieren Sie Erkrankungen, die bei dem Patienten bekannt oder seit der Erstdiagnose aufgetreten sind, durch ankreuzen. Mehrfachnennungen sind möglich.					
<input type="checkbox"/> primär biliäre Zirrhose	<input type="checkbox"/> Wilms-Tumor	<input type="checkbox"/> Blutstammzelltransplantation	<input type="checkbox"/> anderes Malignom	O andere (welche):	
<input type="checkbox"/> Sjögren-Syndrom	<input type="checkbox"/> Morbus Hodgkin	<input type="checkbox"/> Nierentransplantation			
<input type="checkbox"/> Systemische Sklerose	<input type="checkbox"/> Non-Hodgkin-Lymphom	<input type="checkbox"/> Autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom (ALPS)			
<input type="checkbox"/> Systemischer Lupus (SLE)	<input type="checkbox"/> Leukämie	<input type="checkbox"/> MALT-Lymphom			
<input type="checkbox"/> Rheumatoide Arthritis	<input type="checkbox"/> Felty-Syndrom	<input type="checkbox"/> HIV-Infektion			
<input type="checkbox"/> Multiple Sklerose	<input type="checkbox"/> LGL-Syndrom	<input type="checkbox"/> Infektion mit Helicobacter pylori			
<input type="checkbox"/> Glomerulonephritis	<input type="checkbox"/> Vaskulitis	<input type="checkbox"/> Masern-Infektion			
<input type="checkbox"/> Neutropenie	<input type="checkbox"/> Hämolytische Anämie				
<b>2. Klinische Befunde</b>					
Milz (Größe)					o nicht untersucht
Lymphknoten (ggf. Lokalisation vergrößerter Lymphknoten)				o nicht untersucht	
Leber (Größe, ggf. Beschaffenheit)				o nicht untersucht	
Knochenmarkbefund				o nicht untersucht	
Sonstige wesentliche klinische Befunde:				o keine	
<b>3. Laborbefunde</b>					
Rotes und weißes Blutbild					
Erythrozyten	Hb	Retis	Leukozyten	Diff-BB	
o unauffällig					
Klinisch-chemische Befunde					
LDH	Haptoglobin	Quick	PTT	andere (welche):	
o unauffällig					

Freitext:

## Veröffentlichungen

Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, Sachs UJ:

**Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP).**

European Journal of Haematology 2012; 88:167-74

## Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift